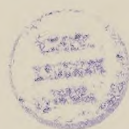


Gert Eisele

EIN VERGLEICH
VERSCHIEDENER
FIBRINOLYSENACHWEISMETHODEN
UND UNTERSUCHUNGEN
ZUM EINFLUSS VON NATRIUM
- PENTOSANPOLYSULFAT
AUF DIE FIBRINOLYSE

Diss. München
1903





Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROFESSOR DR. N. ZÖLLNER

EIN VERGLEICH VERSCHIEDENER FIBRINOLYSENACHWEISMETHODEN
UND UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON NATRIUM - PENTOSAN-
POLYSULFAT AUF DIE FIBRINOLYSE

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG - MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
GERT EISELE
AUS
NEU - ULM

MÜNCHEN 1983

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Professor Dr. N. Goossens

Mitberichterstatter: Professor Dr. N. Zöllner

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.10.1983

1918-1919

Meine Eltern, ich habe die Ehre, Ihnen
hiermit zu schreiben, dass ich die
Ehre habe, Sie zu meinen Eltern zu ernennen.

Meine Eltern, ich habe die Ehre, Ihnen
hiermit zu schreiben, dass ich die
Ehre habe, Sie zu meinen Eltern zu ernennen.

Meine Eltern, ich habe die Ehre, Ihnen
hiermit zu schreiben, dass ich die
Ehre habe, Sie zu meinen Eltern zu ernennen.

Meine Eltern, ich habe die Ehre, Ihnen
hiermit zu schreiben, dass ich die
Ehre habe, Sie zu meinen Eltern zu ernennen.

Meinen Eltern

Mein Dank gilt

Herrn Professor Dr. med. N. Goossens für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung, die er mir und dieser Arbeit gewährte,

Herrn Professor Dr. med. H. Hess für die freundliche Unterstützung bei einem Teil der Untersuchungen,

Herrn Dr. med. H. Rath für seine unermüdliche Hilfe und Betreuung während der gesamten Versuche,

Frl. R. Sturm, Frl. C. Stiehler und Frau R. Reiser für die ausgezeichnete Assistenz bei zahlreichen Versuchen.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. PHYSIOLOGIE UND BIOCHEMIE DER FIBRINOLYSE	
1. Physiologische Bedeutung	5
2. Mechanismus der Fibrinolyse	5
3. Aktivatoren der Fibrinolyse	7
4. Inhibitoren der Fibrinolyse	9
III. VERSUCHSPROGRAMM	
A. Untersuchungen zum Vergleich verschiedener Fibrinolyse nachweismethoden	11
1. Bestimmung der Variationskoeffizienten der Methoden mit standardisiertem Fibrinsubstrat	11
2. Bestimmung des Variationskoeffizienten der Euglobulinlysezeit	12
3. Streptokinase-Aktivierungsreihe	12
4. Untersuchung der Fibrinolyse bei Probanden	13
5. Untersuchung bei Patienten mit therapeutisch aktivierter Fibrinolyse	13
B. Untersuchungen zum Einfluß von Natrium-Pentosan- polysulfat auf die Fibrinolyse	13
1. In vitro Versuche	13
2. In vivo Untersuchungen	14
IV. MATERIALIEN UND METHODEN	
1. Vollblutlysezeitbestimmung	15
2. Euglobulinlysezeitbestimmung	15
3. Staphylokokken-Clumping-Test	17
4. Fibrinplattenmethode	20
5. Glasröhrchen-Diffusionstest	23
6. Standardfibrinpapier-Lysebestimmung	25
7. Gravimetrische Fibrinogenbestimmung	29

V. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE ZUM METHODENVERGLEICH

1. Vorversuche	31
2. Bestimmung der Variationskoeffizienten der Methoden mit standardisiertem Fibrinsubstrat	
a. innerhalb eines Testansatzes	33
b. von Tag zu Tag	34
3. Bestimmung des Variationskoeffizienten der Euglobulinlysezeit	35
4. Streptokinase-Aktivierungsreihe	36
5. Nachversuch	41
6. Untersuchung der Fibrinolyse bei Probanden	44
7. Untersuchung bei Patienten mit therapeutisch aktivierter Fibrinolyse	48

VI. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE ZUR BEEINFLUSSUNG DER FIBRINOLYSE DURCH Natrium-PENTOSANPOLYSULFAT

1. In vitro Versuche	
a. Vorbereitungen	53
b. Testansatz	53
c. Ergebnisse	55
2. Natrium-Pentosanpolysulfat und Heparin als Störfaktoren der Eiweißfärbung mit Amidoschwarz	55
3. In vivo Untersuchungen	63

VII. DISKUSSION

A. Methodenvergleich	
1. Lysezeitbestimmungen	71
2. Nachweis von Fibrinogen-Fibrin-Spaltprodukten mit dem Staphylokokken-Clumping-Test	73

	Seite
3. Lysebestimmung mit standardisiertem Fibrinsubstrat	75
4. Lysemessung nach Streptokinase-Aktivierung	78
B. Beeinflussung der Fibrinolyse durch Natrium-Pentosanpolysulfat	79
VIII. ZUSAMMENFASSUNG	83
IX. LITERATURVERZEICHNIS	87

ABKÜRZUNGEN

ELT	=	Euglobulin Lysis Time
FSP	=	Fibrin-Fibrinogen-Spaltprodukte
FPM	=	Fibrinplattenmethode
GDT	=	Glasröhrchen-Diffusionstest
IE	=	Internationale Einheiten
NPP	=	Natrium-Pentosanpolysulfat
Plg	=	Plasminogen
s	=	Standardabweichung
SCT	=	Staphylokokken-Clumping-Test
SFP	=	Standardfibrinpapier
SFPL	=	Standardfibrinpapier-Lysebestimmung
SK	=	Streptokinase
VLZ	=	Vollblutlysezeit
VK	=	Variationskoeffizient
$\bar{x}$	=	arithmetischer Mittelwert

I. EINLEITUNG

Unter Fibrinolyse verstehen wir die enzymatische Auflösung von Fibringerinnseln durch die Protease Plasmin. Dieses Phänomen war schon seit langer Zeit bekannt. Der Begriff "Fibrinolyse" stammt von dem Franzosen DASTRE, der in einer 1883 erschienen Arbeit den Nachweis erbrachte, daß Blut von Hunden nach einem Aderlaß eine fibrinolytische Aktivität aufwies. Die genauere Erforschung des Vorganges der Fibrinolyse setzte jedoch erst verhältnismäßig spät ein. Dies ist wohl dadurch begründet, daß die Fibrinolyse der Gerinnung nachgeschaltet ist, und daß klinische Erscheinungen, die auf Fibrinolyse beruhen und mit einer Blutungsneigung einhergehen, außerordentlich selten sind. Weitreichende Konsequenzen hatte dann die Beobachtung des Amerikaners TILLET im Jahre 1933, daß Filtrate gewisser Stämme hämolyzierender Streptokokken menschliche Plasmagerinnsel aufzulösen vermochten. Bei weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, daß durch die Streptokokkenfiltrate das im Plasma vorhandene fibrinolytische System aktiviert wurde. Erst die somit gegebene Möglichkeit der exogenen Auslösung der Fibrinolyse und die Hoffnung auf eine therapeutische Nutzung dieses Prinzips gaben den entscheidenden Anstoß für eine eingehende Erforschung der physiologischen und biochemischen Grundlagen. Hierzu war eine entsprechende Methodik notwendig. Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche Verfahren zur Erfassung und Analyse des Fibrinolysevorganges entwickelt. Diese Meßmethoden beruhen im wesentlichen auf den im folgenden beschriebenen Prinzipien.

Bei den sogenannten Lysezeitbestimmungen wird die Zeit bis zur spontanen Wiederauflösung des aus endogenem Fibrinogen entstandenen Gerinnsels gemessen und als Maß für die fibrinolytische Aktivität angegeben. Beispiele hierfür sind die Vollblutlysezeit, die Plasmaplysezeit oder die Euglobulinlysezeit. Um die Fibrinolyse unabhängig vom fibrinbildenden Potential beurteilen zu können, wurden Nachweismethoden mit standardisiertem Fibrinsubstrat erarbeitet. Aus gereinigten Fibrinogenpräparaten her-

gestelltes Fibrin wird in definierter Menge mit der Testlösung (Plasma, Serum, Euglobuline etc.) zusammen inkubiert. Anschließend wird der lysierte bzw. der noch erhaltene Anteil des Fibrins gemessen. Beispiele für diese Art von Nachweismethoden sind die Fibrinplattenmethode, der Glasröhrchen-Diffusionstest und die Standardfibrinpapier-Lysebestimmung. Da das für die Fibrinolyse verantwortliche Enzym Plasmin nicht absolut substratspezifisch für Fibrin ist, sondern auch andere Proteine angreift, wurde versucht, die fibrinolytische Aktivität mit besser standardisierbaren Substraten zu messen, wie zum Beispiel Casein oder Hämoglobin. Auch synthetische Substanzen wie Ester oder Chromogene wurden verwendet. Während die bisher genannten Verfahren alle mehr oder weniger direkt die Wirkung des Plasmins und seiner Aktivatoren erfassen, erlaubt die quantitative Bestimmung der durch Fibrinolyse entstehenden Fibrinsspaltprodukte eine indirekte Aussage über die Aktivität des fibrinolytischen Systems. Der Nachweis der Fibrinsspaltprodukte erfolgt entweder direkt mit immunologischen oder Agglutinationsverfahren oder indirekt über ihre gerinnungshemmende Wirkung. Eine weitere indirekte Möglichkeit zur Erfassung der Fibrinolyse bietet die Messung der inaktiven Plasminvorstufe Plasminogen. Ihr Abfall gegenüber der Norm oder einem Vorwert kann auf eine vermehrte Aktivierung hinweisen.

Trotz der Vielzahl und Vielfalt der angewandten Verfahren sind die methodischen Probleme bei der Analyse des fibrinolytischen Systems keinesfalls als gelöst zu betrachten. Jede der bis heute entwickelten Methoden bietet gewisse Vorteile, die aber zum Teil durch gravierende Nachteile auf anderen Gebieten erkauft werden. Weiterhin sind eine mangelhafte Standardisierung und teilweise fehlende Aussagen hinsichtlich der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der einzelnen Verfahren zu beklagen. Hierdurch werden Aussagekraft und Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus verschiedenen Laboratorien eingeschränkt. Es ist daher ein Ziel dieser Arbeit, die folgenden sechs Nachweismethoden der Fibrinolyse miteinander zu vergleichen:

1. Vollblutlysezeitbestimmung
2. Euglobulinlysezeitbestimmung
3. Staphylokokken-Clumping-Test
4. Fibrinplattenmethode
5. Glasröhrchen-Diffusionstest
6. Standardfibrinpapier-Lysebestimmung

Der Methodenvergleich bezieht sich auf Genauigkeit, Reproduzierbarkeit, Empfindlichkeit, Aussagekraft und Laborfreundlichkeit der einzelnen Verfahren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll zur praktischen Anwendung der Fibrinolyse nachweismethoden der Einfluß von Natrium-Pentosanpolysulfat (NPP) auf das fibrinolytische System untersucht werden. NPP ist ein aus pflanzlichen Ausgangsstoffen semisynthetisch hergestellter Polysaccharidschwefelsäureester und somit eng verwandt mit den Heparinen. Die Polymerkette des NPP setzt sich aus sulfatierten, (1→4) verknüpften β -D-Xylopyranoseresten zusammen. Aufgrund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften ist dieses Molekül als Polyanion der Gruppe der Polyelektrolyte zuzuordnen. Im Gegensatz zu den präparativ gewonnenen Heparinen und Heparinoiden handelt es sich hierbei um eine chemisch genau definierte Substanz mit enger Molekulargewichtsverteilung und einem niedrigen mittleren Molekulargewicht von etwa 2000.

Das biologische Wirkungsspektrum des NPP ist vielfältig. So wurde unter anderem eine Hemmung der Blutgerinnung durch Inhibierung des Faktors Xa (Merckl et al., 44; Vinazzer et al., 60), eine Aktivierung der Lipolyse (Hammerl et al., 22) und eine antiphlogistisch-antirheumatische Wirkung (Kalbhen, 32) beschrieben. Das Hauptinteresse an dieser Substanz richtete sich jedoch auf ihre Wirkung auf das fibrinolytische Potential. Es wurden bereits zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, wonach NPP die Fibrinolyse sowohl in vitro als auch in vivo aktiviert (Halse, 19, 20, 21; Henk et al., 30; Schneider et al., 51; Coccheri et al., 8). Dies führte auch zum Einsatz von NPP bei Prophylaxe

und Therapie von thromboembolischen Erkrankungen. Die mit verschiedenen Testmethoden zum Nachweis der Fibrinolyse gewonnenen Ergebnisse haben jedoch noch einige Fragen offengelassen. So wurde zum Beispiel immer wieder diskutiert, ob der "fibrinolytische Effekt" des NPP nicht durch die Gerinnungshemmung zustande käme, da die Untersuchungen mit exogenem standardisiertem Fibrinsubstrat teilweise enttäuschten. Zur weiteren Klärung dieses Problems soll daher die Wirkung von NPP auf das fibrinolytische System erstmals mit Hilfe der Standardfibrinpapier-Lysebestimmung nach GOOSSENS sowohl in vitro als auch in vivo untersucht werden.

II. PHYSIOLOGIE UND BIOCHEMIE DER FIBRINOLYSE

1. Physiologische Bedeutung

Unter Fibrinolyse verstehen wir die enzymatische Auflösung von Fibringerinnseinseln durch die Protease Plasmin in vivo oder in vitro. Die Fibrinolyse ist ein ubiquitärer Vorgang im Organismus. Ihr kommt eine große Bedeutung bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen zu. Wichtige Beispiele hierfür sind die Lyse von intravasalen Thromben, die Wiederauflösung von Fibrinstrukturen bei reparativen Vorgängen nach Gewebstraumatisierung oder die Gerinnselauflösung nach exsudativen Entzündungen. Die Fibrinolyse ist außerdem nach COPLEY (12) an der Regulation der Kapillarpermeabilität beteiligt. Die wechselseitige Bildung und Wiederauflösung einer Fibrinschicht soll dort den Stoffaustausch beeinflussen. Auch in Flüssigkeiten wie Urin oder Drüsensekreten hat die Fibrinolyse eine wichtige Funktion. Hier verhindert sie eine Verlegung der Ableitungssysteme durch Fibringerinnseinseln. Nach ASTRUP (3) spielt die Fibrinolyse ferner eine Rolle im Rahmen der Fortpflanzung oder beim Wachstum maligner Tumoren, wobei die Zusammenhänge noch unklar und zahlreiche Fragen über die Physiologie und Pathophysiologie der Fibrinolyse offen sind.

2. Mechanismus der Fibrinolyse

Zahlreiche proteolytische Enzyme sind in der Lage, Fibrin zu spalten. Mit dem Begriff der Fibrinolyse wird jedoch ein spezifischer Vorgang beschrieben, bei dem die Verflüssigung von Fibrin durch die Spaltung einiger weniger Peptidbindungen zustande kommt. Das verantwortliche Enzym ist die Serinprotease Plasmin, die neben Fibrin auch Fibrinogen, die Gerinnungsfaktoren V und VIII, Proteohormone, Casein, Gelatine, Lactoglobulin und andere angreift (Koller, 35). Im Organismus kursiert ihr inaktives Proenzym Plasminogen (Plg), dessen native Form (Glu-

Plg) aus einer Peptidkette mit Glutaminsäure am N-terminalen Ende besteht (Wallen und Wiman, 63). Plg wird durch Fibrinolyseaktivatoren in Plasmin umgewandelt. Hierbei entsteht durch Abspaltung von Peptidstücken und Konformationsänderung zunächst ein intermediäres Plg (Lys-Plg), das am N-terminalen Ende die Aminosäure Lysin trägt (Sjoholm et al., 54). Lys-Plg wird in hohem Maß selektiv an Fibrin adsorbiert, während die native Form nur schwach gebunden wird (Thorsen, 57). Verantwortlich für die Interaktion mit Fibrin ist die "lysine binding site" des Plg (Wiman und Wallen, 66). Bei der weiteren Aktivierung wird im Inneren des Lys-Plg-Moleküls eine Arginyl-Valin Bindung gespalten. Das entstehende aktive Plasmin ist ein zweikettiges Polypeptid, dessen Ketten durch eine Disulfidbrücke verbunden sind (Schwick und Heimbürger, 53). Die selektive Adsorption von Plg, Plasmin und Aktivatoren an Fibrin ist der Grund für die Spezifität der Fibrinolyse, obwohl Plasmin kein substratspezifisches Enzym ist (Astrup, 3). Entsteht Plasmin außerhalb von Fibringerinnenseln, so wird es durch Inhibitoren weitgehend neutralisiert und eine generalisierte Proteolyse verhindert.

Die Plasminaktivität führt zum hydrolytischen Abbau des Fibrins. Neben kleineren Peptiden entsteht zunächst das Fragment X und daraus beim weiteren Abbau die Fragmente Y und D. Fragment Y zerfällt schließlich in zwei weitere Untereinheiten D und E. Diese Fragmente, die als Fibrinspaltprodukte (FSP) bezeichnet werden, haben einen gerinnungshemmenden Effekt (Witt, 67). Sie sind weitgehend mit denen identisch, die bei der Spaltung von Fibrinogen durch Plasmin entstehen. Möglicherweise vermindern die FSP die spontane Inaktivierung von Plasmin (Mysliwiec et al., 46).

Die Regulation des fibrinolytischen Systems ist außerordentlich komplex. Fibrinbildung (Gerinnung) und Fibrinolyse befinden sich in einem fein abgestimmten Gleichgewicht, das auf einem komplizierten Ineingangreifen von Aktivatoren und Inhibitoren auf beiden Seiten beruht. Kleinste Schwankungen auf

der einen Seite rufen sofort Gegenregulationen auf der anderen Seite hervor, so daß überschießende Reaktionen, die für den Organismus katastrophale Folgen hätten, vermieden werden können. Die Aktivatoren und Inhibitoren der Fibrinolyse sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3. Aktivatoren der Fibrinolyse

Die Umwandlung von Plg in Plasmin wird durch Aktivatoren bewirkt, von denen mehrere bekannt sind. Der Gewebe-Aktivator kommt in einem ganz bestimmten Verteilungsmuster in den Geweben des Organismus vor. Einen hohen Gehalt weisen Prostata, Uterus, Lunge, Ovarien und Testes auf, jedoch wurde der Aktivator auch in quergestreifter Muskulatur, Herzmuskulatur und Milz gefunden. Leber und Aorta sind nahezu aktivatorfrei (Albrechtsen, 1; Witte, 68). Nachgewiesen wurde die Produktion von Gewebe-Aktivator in Endothelzellen, Epithelzellen, Serosazellen, Synovialzellen und Blutzellen. Dort ist er fest an zelluläre Strukturen gebunden. Die Bildung und Freisetzung des Aktivators konnte mit den verschiedenen Stadien des Zellzyklus in Zusammenhang gebracht werden, die Mechanismen sind jedoch noch ungeklärt (Astrup, 3).

Urokinase ist ein aus menschlichem Harn extrahierbarer Aktivator. Er unterscheidet sich in einigen Eigenschaften vom Gewebe-Aktivator und wird weniger stark als dieser an Fibrin adsorbiert. Wahrscheinlich wird die Urokinase von den Epithelzellen der ableitenden Harnwege gebildet und bei deren Degeneration abgegeben (Astrup, 3).

Im Blut kann die Fibrinolyse von zwei Seiten her aktiviert werden: durch einen extrinsischen und einen intrinsischen Aktivator. Beide sind labil und normalerweise nur in geringen Mengen vorhanden (Witt, 67). Die Herkunft des extrinsischen Aktivators ist noch ungeklärt. Möglicherweise handelt es sich um eine labile Form des Gewebe-Aktivators, der von den Endothelzellen unter bestimmten Bedingungen ins Blut abgegeben wird (Astrup, 3). Wäh-

rend die bisher genannten Aktivatoren Plg direkt über Lys-Plg zu Plasmin aktivieren, existiert im intrinsischen System ein stabiler, inaktiver Proaktivator. Er kann spontan (Stamm, 56), durch Proteasen wie Kallikrein oder durch den aktivierten Faktor XII (Heimbürger, 29) zum Aktivator umgewandelt werden. An dieser Stelle ist die Fibrinolyse eng mit dem Gerinnungssystem verknüpft.

Ein unphysiologischer Aktivator, der jedoch in der Grundlagenforschung und in der Klinik große Bedeutung erlangt hat, ist die Streptokinase (SK). Als Stoffwechselprodukt β -hämolisierender Streptokokken kommt er normalerweise nicht im menschlichen Organismus vor, jedoch sind bei fast allen Erwachsenen Antikörper gegen SK nachzuweisen als Ausdruck früherer Streptokokkeninfekte. Auch SK aktiviert die Fibrinolyse über einen Proaktivator. Zahlreiche Autoren kamen durch ihre Untersuchungen zu dem Schluß, daß dieser Proaktivator identisch ist mit dem humanen Plg (Kline und Fishman, 34; Schwick und Heimbürger, 53; Spöttl und Constantini, 55). Dieses Molekül wurde daher auch als Proaktivator-Plasminogen bezeichnet. SK verbindet sich mit humanem Plg zu einem Komplex, der den eigentlichen Aktivator darstellt. Dieser Vorgang läuft nach einer dem Massenwirkungsgesetz ähnlichen Kinetik ab (Martin, 41, 42). Ferner scheint diese Reaktion speziesspezifisch zu sein, da sie zum Beispiel mit bovinem Plg nicht zustande kommt. Der Plg-SK-Komplex wandelt in einem zweiten Schritt nach dem gleichen Mechanismus wie körpereigene Aktivatoren Plg in Plasmin um (Blatt et al., 5). Dieser Schritt ist auch mit bovinem Plg möglich, was in verschiedenen Tests zur Messung des Aktivators ausgenützt wird. SK kann aber auch mit Plasmin einen Komplex bilden, der ebenfalls Aktivatoreigenschaften hat. Die fibrinolytische Aktivität des Plasmins geht dabei jedoch verloren (Schwick und Heimbürger, 53). Neben den bisher genannten Aktivatoren gibt es noch eine ganze Reihe von Faktoren, die in vivo eine Fibrinolyse induzieren, wie zum Beispiel Stress, Schock, Pyrogene und Allergene (Vinazzer, 59). Auch sind zahlreiche Pharmaka wie Heparin, Heparinoide, Nikotinsäure und Sulfonylharnstoffe beschrieben, die eine fibrinolysesteigernde Wir-

kung entfalten. Die ablaufenden Mechanismen sind jedoch noch größtenteils ungeklärt, so daß hier nicht näher darauf eingegangen werden soll.

4. Inhibitoren der Fibrinolyse

Die Regulation eines so komplexen Systems wie der Fibrinolyse wäre undenkbar ohne hemmende Mechanismen. Bei den Inhibitoren lassen sich prinzipiell zwei Gruppen unterscheiden, zum einen die Antiplasminе, die aktives Plasmin hemmen, zum anderen die Antiaktivatoren, die verhindern, daß Plg zu Plasmin umgewandelt wird.

Folgende Antiplasminе wurden im Blut nachgewiesen: α_1 -Antitrypsin, Antithrombin III, C1-Inaktivator und α_2 -Makroglobulin (Heimburger, 28). Das α_1 -Antitrypsin wirkt als Progressivinhibitor und hemmt Plasmin irreversibel. Antithrombin III und α_2 -Makroglobulin hingegen sind Sofortinhibitoren. Sie binden Plasmin reversibel und können es bei Kontakt mit Fibrin wieder abgeben. Möglicherweise fungieren sie als Speicher für Plasmin (Schwick und Heimburger, 53). COLLEN et al. (10) und andere Autoren entdeckten in den letzten Jahren einen weiteren Inhibitor, den sie Antiplasmin nannten. Dieses Antiplasmin ist ebenfalls ein Sofortinhibitor und nicht mit den oben genannten identisch. Die Interaktion mit Plasmin erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird ein noch dissoziabler Komplex gebildet, der in einem zweiten Schritt in einen irreversiblen Komplex übergeführt wird. Plasmin, dessen Bindungsstelle für Fibrin besetzt ist, wird nicht inhibiert. Hieraus wurde geschlossen, daß Antiplasmin die Aufgabe hat, freies, d. h. nicht an Fibrin gebundenes Plasmin zu hemmen und eine generalisierte Proteolyse zu verhindern (Wiman und Collen, 65). Weitere Inhibitoren vom Antiplasmintyp konnten aus verschiedenen Geweben wie Pankreas, Milz, Leber oder Parotis isoliert werden. Zu dieser Kategorie gehört auch das Trasylol^R. Neben der Antiplasminwirkung haben die genannten Proteinaseinhibitoren noch zahlreiche andere Hemmfunk-

tionen (Heimbürger, 29), auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Der Nachweis eigenständiger physiologischer Antiaktivatoren gelang erst vor relativ kurzer Zeit. HEDNER (26) fand ein extrem instabiles α_2 -Globulin, das die Aktivierung von Plg durch Urokinase und Streptokinase hemmt. Dieser Antiaktivator ist in besonders hoher Konzentration bei Patienten mit akuter Urämie nach Nierentransplantation anzutreffen.

Zu erwähnen sind noch die synthetischen Fibrinolyseinhibitoren, die eine große praktische Bedeutung erlangt haben. Zu dieser Gruppe zählen Epsilon-Aminocaprinsäure (EACA), para-Aminomethylbenzoesäure (PAMBA) und Aminomethylcyclohexancarbonsäure (AMCHA). Wahrscheinlich interferieren sie mit der Anlagerung von Plg und Plasmin an Fibrin.

III. VERSUCHSPROGRAMM

Aus der in der Einleitung erläuterten Problemstellung und den Zielen dieser Arbeit ergab sich das im folgenden beschriebene Versuchsprogramm.

A. Untersuchungen zum Vergleich verschiedener Fibrinolysenachweismethoden

Die nachgenannten sechs Fibrinolysenachweismethoden werden hinsichtlich Genauigkeit, Reproduzierbarkeit, Empfindlichkeit, Aussagekraft und Laborfreundlichkeit miteinander verglichen.

- a. Vollblutlysezeitbestimmung (VLZ)
- b. Euglobulinlysezeitbestimmung (ELT)
- c. Staphylokokken-Clumping-Test (SCT)
- d. Fibrinplattenmethode (FPM)
- e. Glasröhrchen-Diffusionstest (GDT)
- f. Standardfibrinpapier-Lysebestimmung (SFPL)

Der Schwerpunkt des Methodenvergleichs liegt auf den Verfahren mit standardisiertem Fibrinsubstrat (d, e und f). Folgende Untersuchungen sollen durchgeführt werden:

1. Bestimmung der Variationskoeffizienten der Methoden mit standardisiertem Fibrinsubstrat

a. innerhalb eines Versuchsansatzes. Hierzu wird die fibrinolytische Aktivität einer Testlösung (mit SK aktiviertes frisches Citratplasma) an einem Versuchstag mehrfach im selben Testansatz jedes der drei Verfahren d, e und f gemessen. Die jeweilige relative Standardabweichung der Meßwerte ist ein Maß für den methodisch bedingten Fehler der Bestimmungen und somit für die Genauigkeit der einzelnen Fibrinolysetestes.

b. von Tag zu Tag. Die lytische Aktivität eines Kontrollstandards wird an zehn Versuchstagen mitbestimmt. Als Standard soll Plg-Lösung verwendet werden, die man kurz vor Versuchsbeginn mit SK aktiviert. Die Plg-Lösung ist nach Angaben des Herstellers (Behringwerke AG) bei -20° C für etwa vier Wochen stabil. Die Variationskoeffizienten (VK) dieser Kontrollwerte dienen zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der einzelnen Verfahren. Für die SFPL ist dieser VK von früheren Untersuchungen in unserem Labor her bereits bekannt (Goossens, 14; Thym, 58). Wir beschränken uns daher auf seine Bestimmung für die FPM und den GDT.

2. Bestimmung des Variationskoeffizienten der Euglobulinlysezeit

Frisch entnommenes Citratplasma wird mit SK aktiviert, um eine ELT im mittleren Bereich zu erhalten. Anschließend wird die Bestimmung der ELT zwölfmal durchgeführt. Aus den Resultaten berechnet man den VK als Maß für die Reproduzierbarkeit.

3. Streptokinase-Aktivierungsreihe

SK ist derzeit die wichtigste und am häufigsten verwendete Substanz zur Aktivierung des fibrinolytischen Potentials. Aus diesem Grund sollen die Testmethoden mit standardisiertem Fibrinsubstrat und die ELT anhand einer SK-Aktivierungsreihe miteinander verglichen werden. Hierzu wird aus frischem Citratplasma eine Aktivierungsreihe mit SK-Konzentrationen von 2, 4, 6, 8, 10, 20, 50 und 100 IE/ml Plasma erstellt und jede Aktivierungsstufe in die genannten Tests eingesetzt. Diese Versuche sollen uns über das Verhalten der einzelnen Methoden bei zunehmender SK-Aktivierung und somit über die Vergleichbarkeit der Meßwerte orientieren.

4. Untersuchung der Fibrinolyse bei Probanden

In diesem Abschnitt soll Blut bzw. Plasma von zehn klinisch gesunden männlichen Probanden (Alter zwischen 24 und 35 Jahre) untersucht werden. An jedem Versuchstag werden einem Probanden ca. 3 ml Vollblut und 30 ml Citratblut 1:10 abgenommen. Die Abnahme erfolgt jeweils zwischen 9.00 und 10.30 Uhr. Die Probanden müssen vor der Blutentnahme keine besonderen Bedingungen einhalten, da hier festgestellt werden soll, inwieweit die einzelnen Tests interindividuelle Unterschiede der spontanen Fibrinolyse erfassen können. Dies ergibt sich aus der Streubreite der Meßergebnisse im Vergleich zum methodisch bedingten Fehler und erlaubt eine Beurteilung der Empfindlichkeit der Testmethoden.

5. Untersuchung bei Patienten mit therapeutisch aktivierter Fibrinolyse

In Analogie zum vorigen Abschnitt werden Patienten untersucht, die aufgrund arterieller Verschlüsse im femoro-poplitealen Strombahngebiet mit der Katheterlyse nach HESS (31) behandelt wurden. Bei dieser Therapie wird die Fibrinolyse in vivo mit SK aktiviert. Anhand dieser Untersuchungen soll die Aussagekraft der Fibrinolysetests und die Korrelation ihrer Meßwerte verglichen werden. Zum Abschluß erfolgt aufgrund der Erfahrungen in der praktischen Anwendung eine kritische Beurteilung des Aufwandes und der Laborfreundlichkeit der einzelnen Testmethoden.

B. Untersuchungen zum Einfluß von Natrium-Pentosanpolysulfat auf die Fibrinolyse

1. In vitro Versuche

Bei den folgenden Experimenten soll mit Hilfe der SFPL die Fra-

ge geklärt werden, ob NPP die Fibrinolyse in vitro aktivieren kann und Einfluß auf die Aktivierung durch SK hat. Wir messen hierzu die lytischen Aktivitäten von reiner Plg-Lösung und Plasma, denen wir im Testansatz der SFPL NPP in Konzentrationen von 10, 25, 50 und 100 µg/ml (Endkonzentration im Ansatz) zugeben. Im einzelnen sind folgende Ansätze vorgesehen:

- a. Plg-Lösung + NPP
- b. Plg-Lösung + SK + NPP
- c. Citratplasma + NPP
- d. Citratplasma + SK + NPP

Jeder Versuch wird dreifach durchgeführt, wobei wir für c und d drei verschiedene Plasmen verwenden.

2. In vivo Untersuchungen

In diesem Versuchsteil soll an sechs männlichen Probanden der Einfluß von NPP auf die Fibrinolyse in vivo untersucht werden. Zur Testung der Wirkung von Pharmaka auf das fibrinolytische Potential sind nach HARENBERG et al. (23) die Nachmittagsstunden am geeignetsten, da hier die spontane Fibrinolyse im Rahmen der circadianen Rhythmik ein Plateau aufweist, und somit die intraindividuellen Schwankungen am geringsten sind. Wir beginnen daher mit den Versuchen jeweils zwischen 12.30 und 14.00 Uhr. Nach einer Blutentnahme für die Basalwerte injizieren wir den Probanden 150 mg NPP intravenös. Die weiteren Blutentnahmen erfolgen direkt im Anschluß an die Injektion sowie nach 15, 45, 120 und 240 Minuten. Die entnommenen Proben werden in folgende Tests eingesetzt:

- a. SFPL
- b. FPM (Plg-reiches und -freies Fibrinsubstrat)
- c. GDT (Plg-reiches und -freies Fibrinsubstrat)
- d. ELT
- e. Gravimetrische Fibrinogenbestimmung

Die notwendigen statistischen Berechnungen werden nach den üblichen Regeln durchgeführt (Ramm und Hofmann, 49).

IV. MATERIALIEN UND METHODEN

1. Vollblutlysezeitbestimmung (Vinazzer, 59)

1 ml frisch entnommenes Blut wird ohne Zusätze unter Vermeidung von Schaumbildung in ein nicht silikonisiertes Glasröhrchen (15 x 100 mm) pipettiert und im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Nach einigen Minuten tritt eine vollständige Gerinnung ein. Um die Fibrinpolymerisation nicht zu stören, sind Erschütterungen zu vermeiden. Anschließend kontrolliert man im Abstand von etwa 30 Minuten die spontane Wiederauflösung des Gerinnsels. Es werden hierbei Doppelbestimmungen durchgeführt. Normalerweise tritt innerhalb von 24 Stunden keine vollständige Lyse ein. Bei verstärkter Aktivität des lytischen Systems ist die Lysezeit verkürzt. Das Ergebnis ist als qualitativ zu betrachten.

2. Euglobulinlysezeitbestimmung (Conrad, 11)

Prinzip

Verdünt man zellfrei zentrifugiertes Citratplasma mit Aqua bidest. und senkt den pH-Wert auf 5,2 bis 5,6, so fällt ein Teil der Plasmaeiweiße, die sogenannten Euglobuline, aus. Die Euglobulinfraktion enthält die meisten Gerinnungs- und Lysefaktoren, wobei die einzelnen Komponenten je nach Art der angewandten Methode zu 50 bis 100 % präzipitieren (Graeff und Beller, 17). Die Albumine und der größte Teil der Fibrinolyseinhibitoren bleiben in Lösung. Durch Zentrifugieren isoliert man die Euglobuline im Sediment. Der Überstand mit den Antiplasminen wird verworfen. Anschließend löst man das Sediment wieder auf, bringt die Lösung durch Zusatz von Thrombin zur Gerinnung und mißt die Zeit vom Gerinnungseintritt bis zur kompletten Lyse des Gerinnsels. Durch die Ausschaltung der Inhibitoren ist die Euglobulinlysezeit wesentlich kürzer als die Vollblut- oder Plasmaplysezeit. Die ELT wird in zahlreichen Modifikationen bestimmt (Conrad, 11; Graeff und Beller, 17; v. Kaulla und Schultz, 33;

Vinazzer, 59). Wir arbeiten bei unseren Versuchen mit der von CONRAD (11) beschriebenen Methode.

Benötigtes Material

- Wasserbad, 37° C
- Zentrifuge AHT, Type 5000 mit großen Einsätzen
- Sarstedt^R Monovetten für Gerinnungsuntersuchungen, 10 ml
- Erlenmeyerkolben, 50 ml
- Polystyrolröhrchen, 15 x 100 mm und 20 x 100 mm
- Plastikspatel
- Aqua bidest.
- 1 %ige Essigsäure
- Gepufferte Kochsalzlösung, bestehend aus 1 Teil Natrium-Barbital-Acetat-Puffer und 4 Teilen physiologischer Kochsalzlösung
- Thrombin (Topostasin^R von Hoffmann-La Roche), verdünnt in physiol. Kochsalzlösung auf 20 NIH-Einheiten/ml
- Kühlschrank, 4° C

Durchführung

Durch Venenpunktion wird mit Hilfe von Monovetten Citratblut in einer Verdünnung von 1:10 (1 Teil 3,8 %ige Citratlösung und 9 Teile Blut) gewonnen. Sofort anschließend zentrifugiert man 15 Minuten bei 3000 rpm, hebert das Plasma ab und verwirft die korpuskulären Anteile. Auf diese Weise erhält man thrombozytenarmes Citratplasma, das bei Lagerung im Kühlschrank (4° C) innerhalb von 2 Stunden verarbeitet werden sollte.

In einem 50 ml Erlenmeyerkolben vermischt man 1 ml Citratplasma und 15 ml eisgekühltes Aqua bidest. Nach Zusatz von 300 µl 1 %iger Essigsäure wird der Kolben mit Parafilm verschlossen und bei 4° C inkubiert. Während dieser Zeit fallen die Euglobuline aus, und die Lösung trübt sich. Nach zehnminütiger Inkubation dekantiert man die Lösung in ein vorgekühltes Polystyrolröhrchen (20 x 100 mm) und zentrifugiert für 5 Minuten bei 3000 rpm. Der Überstand wird verworfen und die Innenseite der Röhrchen mit Löschpapier abgetrocknet, ohne das Sediment zu berühren. Das Präzipitat wird in 1 ml vorgekühlter gepufferter

Kochsalzlösung mit Hilfe eines Plastikspatels vollständig aufgelöst. Je 300 µl dieser Euglobulinlösung werden in 2 Polystyrolröhrchen (15 x 100 mm) pipettiert. Jetzt werden je 0,1 ml Thrombinlösung zugesetzt, die Röhrchen sofort mit Stopfen verschlossen und der Inhalt durch einmaliges Umstülpen ohne Blasenbildung durchmischt. Anschließend werden die Proben in ein auf 37° C temperiertes Wasserbad gestellt. Die vollständige Gerinnung tritt normalerweise innerhalb von 1 bis 2 Minuten ein. Stärkere Erschütterungen sollten in dieser Phase vermieden werden, um den Gerinnungsvorgang nicht zu stören. Man mißt die Zeiten von der Thrombinzugabe bis zur kompletten Auflösung der Gerinnsel in beiden Röhrchen und bildet den Mittelwert. Die ELT ist unter normalen Bedingungen größer als 3 Stunden. Werte unter 3 Stunden weisen auf eine gesteigerte Fibrinlyse hin.

3. Staphylokokken-Clumping-Test zum Nachweis von Fibrinogen-Fibrinsspaltprodukten (Hawiger et al., 25; Lipinski et al., 37)

Prinzip

Der Staphylococcus aureus Stamm Newman D₂C trägt auf seiner Oberfläche den sogenannten "Clumping-Faktor". Dieser reagiert mit Fibrinogen, Fibrinmonomeren und den frühen Spaltprodukten X und Y, so daß es zu einer makroskopisch sichtbaren Verklumpung der Staphylokokken kommt. Mit den reinen Spaltprodukten D und E tritt keine Reaktion ein. Zur alleinigen Erfassung der FSP X und Y muß Serum verwendet werden, von dem eine geometrische Verdünnungsreihe erstellt wird. Ein Aliquot jeder Verdünnungsstufe wird mit standardisierter Staphylokokkensuspension vermischt und die Verklumpungsreaktion abgelesen. Aus der höchsten Titerstufe, die noch zur Verklumpung führt, läßt sich auf die FSP-Konzentration schließen. Nach HAWIGER et al. (25) liegt die mögliche untere Nachweisgrenze für FSP bei 0,5 µg/ml. Die Verklumpungsreaktion kann sowohl in Röhrchen als auch auf Kunststoffplatten geprüft werden. Zu unseren Arbeiten verwenden wir das FSP-Testbesteck der Behringwerke AG, Marburg.

Benötigtes Material

- Wasserbad, 37° C
- Zentrifuge AHT, Type 5000
- Polystyrolröhrchen, 15 x 100 mm
- Testplatte aus Kunststoff
- Plastikspatel
- Stoppuhr
- Test-Thrombin, Behringwerke AG, 30 NIH-Einheiten/ml, gelöst in CaCl_2 -Lösung, 0,025 mmol/l
- FSP-Testbesteck, Behringwerke AG, bestehend aus
Staphylokokken-Reagenz: Staph. aureus Newman D₂C, koagulase-negativ, abgetötet und in Suspension stabilisiert, geöffnet bei 4-6° C für 3 Tage stabil;
Aprotinin: polyvalenter Proteinaseinhibitor, 100 APE;
Tris-Puffer-Konzentrat: Anwendung in zehnfacher Verdünnung, pH 7,4;

Serumgewinnung

Thrombozytenarmes Citratplasma wird wie unter IV. 2. beschrieben gewonnen. In einem Reagenzglas werden 1 ml frischen Citratplasmas zuerst 0,05 ml Aprotininlösung zur Fibrinolysehemmung und anschließend 1 ml Thrombinlösung zugesetzt. Der Ansatz wird durch Schütteln gut durchmischt und im Wasserbad bei 37° C für 30 Minuten inkubiert. Danach wird das entstandene Gerinnsel 10 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert und das überstehende Serum abgehebert.

Testdurchführung

Aus dem gewonnenen Serum wird mit Tris-Puffer eine geometrische Verdünnungsreihe (etwa 8 bis 10 Stufen) erstellt. Beginnend mit unverdünntem Serum werden nacheinander die einzelnen Titerstufen getestet. Hierzu gibt man jeweils 50 µl Serumverdünnung auf die schwarze Testplatte. Daneben pipettiert man 50 µl der vorher kräftig geschüttelten Staphylokokkensuspension. Mit einem Rührspatel werden die beiden Tropfen auf der Testplatte vermischt und die Stoppuhr gestartet. Die Testplatte wird durch rotierende Bewegungen genau 2 Minuten lang geschwenkt. Sofort

anschließend wird die Verklumpung, die gegen den schwarzen Untergrund der Testplatte gut sichtbar ist, abgelesen. Ergibt sich mit unverdünntem Serum keine Reaktion, so ist der Test beendet. Zur Prüfung der Staphylokokkensuspension auf Spontanagglutination wird ein Leerwert mit Tris-Puffer anstelle von Serum mitgeführt.

Auswertung

Der Reziprokwert der jeweiligen Serumverdünnung gibt die Titerstufe T an. Multipliziert man die höchste Titerstufe, die noch eine Verklumpung ergibt, mit einem Korrekturfaktor F, so erhält man eine Maßzahl für die FSP-Konzentration. Der Korrekturfaktor berücksichtigt die Verdünnung durch Citratlösung, Aprotinin und Thrombinlösung sowie einen Normalhämatokrit von 0,46. Der Faktor beträgt 2,5. Durch Multiplikation der Maßzahl mit der unteren Nachweisgrenze, die bei dieser Modifikation des SCT 10 µg/ml beträgt, erhält man die FSP-Konzentration in µg/ml. Die Formel zur Berechnung lautet:

$$\text{FSP-Konzentration} = T \times 2,5 \times 10 \text{ µg/ml}$$

Normalerweise liegen die FSP-Konzentrationen unter 25 µg/ml, so daß mit unverdünntem Serum keine Agglutination zustande kommt. Erhöhte FSP-Werte weisen auf Fibrinolysevorgänge hin. Sie werden gefunden bei Lebererkrankungen, Karzinomen, Schock, Thrombosen und Urämie (Nilehn, 47; Hedner, 27), wobei Werte über 1000 µg/ml erreicht werden können.

4. Fibrinplattenmethode (Modif. nach Brakman und Astrup, 6)

Prinzip

In einer Petrischale wird eine definierte Menge an Fibrinogenlösung durch Thrombinzusatz zur Gerinnung gebracht, so daß eine dünne Fibrinschicht entsteht. Auf diese Fibrinschicht gibt man einen Tropfen der auf lytische Aktivität zu untersuchenden Testlösung und inkubiert die Fibrinplatte. Anschließend mißt man den

Durchmesser der um den Testtropfen entstandenen Lysezone aus. Er ist ein Maß für die lytische Aktivität der Testlösung. Zur Herstellung der Fibrinplatten wird im allgemeinen plasminogenreiches Rinderfibrinogen verwendet. Dadurch werden im Test vor allem Fibrinolyseaktivatoren erfaßt. Mit plasminogenfreiem Fibrinsubstrat hingegen wird die reine Plasminwirkung gemessen. Plg-freie Fibrinplatten können dadurch hergestellt werden, daß man die fertigen Platten erhitzt und das darin enthaltene Plg zerstört (Lassen, 36). Dieses Vorgehen hat jedoch den Nachteil, daß dabei auch Fibrin teilweise denaturiert, und die Methode somit weniger empfindlich wird (Stamm, 56). Wir verwenden daher bei unseren Versuchen zur Herstellung der Fibrinplatten sowohl Plg-reiches als auch Plg-freies Rinderfibrinogen der Behringwerke AG.

Benötigtes Material

- Wasserbad, 37° C
- Heräus-Inkubator, 37° C
- Petrischalen aus Plastik, Ø 90 mm, Höhe 15 mm
- Thrombin (Topostasin^R von Hoffmann-La Roche), verdünnt in physiol. Kochsalzlösung auf 20 NIH-Einheiten/ml
- Fibrinogen vom Rind (Behringwerke AG), Plg-reich, mindestens 90 % gerinnbares Protein, lyophilisiert, Flaschen à 600 mg
- Fibrinogen vom Rind (Behringwerke AG), Plg-frei, Faktor XIII-frei, lyophilisiert, Flaschen à 600 mg
- 0,1 n HCl-Lösung
- Aqua bidest.
- Natrium-Diäthylbarbiturat (Merck)
- "Salzlösung", bestehend aus 4,89 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,79 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ und 109,12 g NaCl ad 1000 ml Aqua bidest.
- 1/15 m Phosphatpuffer, pH 7,4

Herstellung des Fibrinplattenpuffers

20,62 g Natrium-Diäthylbarbiturat werden in 1350 ml Aqua bidest. aufgelöst. Nach Zugabe von 500 ml 0,1 n HCl-Lösung und 100 ml "Salzlösung" wird der pH der Lösung mit 0,1 n HCl-Lösung auf 7,75 gebracht. Anschließend wird mit destilliertem Wasser auf

ein Endvolumen von 2000 ml aufgefüllt. Der Fibrinplattenpuffer muß sorgsam vor Verunreinigung und mikrobieller Kontamination geschützt werden, da es sonst zu Störungen im Test mit spontaner Lyse der Fibrinschicht kommt. Bei unseren Versuchen war der Puffer für etwa 6 bis 8 Wochen verwendbar.

Herstellung der Fibrinogenlösungen

Zur Fertigung der Fibrinplatten benötigt man eine 0,1 %ige Fibrinogenlösung. Eine entsprechende Fibrinogenmenge wird abgewogen, in ein Reagenzglas überführt und mit Fibrinplattenpuffer versetzt (1/10 des Endvolumens der Lösung). Da die lyophilisierten Fibrinogenpräparate schlecht löslich sind, wird der Lösungsansatz für 10 Minuten in ein Wasserbad von 37° C gestellt, um die Spontanquellung des Proteins zu beschleunigen. Danach werden noch ungelöste Anteile mit Hilfe eines Glasstabes verteilt und in Lösung gebracht. Die jetzt 1 %ige Lösung wird in ein Becherglas gegeben und mit Fibrinplattenpuffer auf 0,1 % verdünnt. Hierbei ist auf peinliche Sauberkeit aller Gefäße und Pipetten zu achten, da bereits geringe Verunreinigungen durch Thrombin eine Gerinnung auslösen würden. Die fertige Fibrinogenlösung muß noch am selben Tag verarbeitet werden.

Herstellung der Fibrinplatten

6 ml der 0,1 %igen Fibrinogenlösung werden mit einer Vollpipette in eine Petrischale pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl Thrombinlösung wird die Petrischale mit dem Deckel verschlossen und der Inhalt 10 Sekunden lang durch rotierende Bewegungen vermischt. Sofort anschließend stellt man die Petrischale auf eine Glasplatte, deren vollkommen horizontale Lage vorher mit einer Wasserwaage überprüft wurde. Nach etwa 30 Minuten ist die Fibrinogenlösung geronnen. Die entstandene Fibrinschicht hat eine Dicke von etwa 1 mm. Die Fibrinplatten sind jetzt gebrauchsfertig und müssen noch am selben Tag verwendet werden.

Durchführung des Tests

Als Testmaterial verwenden wir Euglobulinlösungen. Diese werden wie unter IV. 2. beschrieben frisch hergestellt und direkt an-

schließlich in den Test eingesetzt. Zur Wiederauflösung der Euglobulinfraktion wird hierbei jedoch 1/15 m Phosphatpuffer pH 7,4 anstelle des Natrium-Barbital-Acetat-Puffers verwendet. Mit Hilfe einer 0,1 ml Glaspipette tropft man 30 µl Euglobulinlösung auf die Platte. Für jede Bestimmung beschickt man eine Fibrinplatte mit drei Tropfen derselben Lösung. Die Platten werden anschließend verschlossen und 18 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Ablageflächen des Wärmeschrankes müssen vollkommen horizontal sein, da man sonst keine runden Lysezonen erhält. Ebenso sind während der Inkubation Erschütterungen und Temperaturschwankungen durch häufiges Öffnen des Schrankes zu vermeiden.

Auswertung

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Fibrinplatten auf eine schwarze Unterlage gestellt. Bei seitlicher Beleuchtung sind die entstandenen Lysezonen gut erkennbar. Mit einem Stechzirkel werden von jeder Lysezone zwei aufeinander senkrecht stehende Durchmesser abgenommen und ausgemessen. Aus den Dreifachbestimmungen ergeben sich sechs Durchmesser, deren Mittelwert in mm als Ergebnis der Lysebestimmung angegeben wird. Stark unregelmäßig geformte Lysehöfe werden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

5. Glasröhrchen-Diffusionstest auf der Grundlage eindimensionaler Diffusion (Yasukouchi et al., 69; Yasukouchi und Watanabe, 70)

Prinzip

Glasröhrchen von 75 mm Länge und 3,5 mm Innendurchmesser werden bis zu einer vorgegebenen Markierung mit Fibrinogenlösung aufgefüllt, der kurz vor dem Einpipettieren Thrombin zugesetzt wurde. Nach Eintritt der Gerinnung überschichtet man die entstandenen Fibrinsäulchen mit der Testlösung und inkubiert die Röhrchen 18 Stunden bei 37° C. Anschließend mißt man von der Markierung ab den lysierten Anteil der Fibrinsäule aus. Diese

sogenannte Lysehöhe ist das Maß für die lytische Aktivität der Testflüssigkeit. Der GDT wird mit Plg-reichem und Plg-freiem Rinderfibrinogen als Substrat durchgeführt. Als Testlösungen müssen Euglobuline eingesetzt werden, da mit Plasma offenbar keine ausreichende Lysemessung möglich ist.

Benötigtes Material

- Heräus-Inkubator, 37° C
- Glasröhrchen, Länge 75 mm, Innendurchmesser 3,5 mm
- Kitt
- Kanülen, Länge 60 mm, Ø 1 mm
- Petrischalen aus Glas, Ø 60 mm, Höhe 15 mm
- Einmalspritzen (Braun), 5 ml
- Thrombin (Topostasin^R von Hoffmann-La Roche), verdünnt in physiol. Kochsalzlösung auf 20 NIH-Einheiten/ml
- Fibrinogenpräparate siehe unter "Fibrinplattenmethode"
- 1/15 m Phosphatpuffer, pH 7,4
- Paraffinöl, dickflüssig

Vorbereitung

Von einem Glasrohr (Innendurchmesser 3,5 mm) werden Stücke von 75 mm Länge abgeschnitten, denen in einer Höhe von 50 mm ein Markierungsring eingeritzt wird. Diese Röhrchen können mehrfach verwendet werden, müssen vor Gebrauch aber sorgfältig gereinigt, mit Aqua bidest. gespült und anschließend bei 100° C getrocknet werden, da Salzreste bzw. mikrobieller Bewuchs das Testergebnis beeinflussen. Das untere Ende der Glasröhrchen wird mit Kitt dicht verschlossen. Für den GDT kann dieselbe Fibrinogenlösung verwendet werden wie zur Herstellung der Fibrinplatten. YASUKOUCHI et al. (69) geben zwar als Lösungsmittel für Fibrinogen 1/15 m Phosphatpuffer pH 7,4 an, in unseren Vorversuchen konnten wir jedoch keinen Unterschied zwischen diesem und dem von uns verwendeten Fibrinplattenpuffer feststellen. Die zur Testdurchführung benötigten Euglobulinlösungen werden wie unter IV. 2. beschrieben jeweils frisch hergestellt. Zur Wiederauflösung der Euglobuline benutzen wir wie bei der Fi-

brinplattenmethode Phosphatpuffer.

Herstellung der Fibrinröhrchen

In einer Petrischale ($\emptyset$ 60 mm) werden 4,5 ml der 0,1 %igen Fibrinogenlösung mit 50 μ l Thrombinlösung durch rotierende Bewegungen vermischt. Da die ersten Gerinnsel nach etwa 5 Minuten auftreten, muß die Lösung innerhalb dieser Zeit in die vorbereiteten Röhrchen gefüllt werden. Hierzu ziehen wir die gesamte Flüssigkeit über eine 60 mm lange Kanüle in eine 5 ml Einmalspritze auf, führen die Kanüle jeweils in ein Röhrchen ein und und füllen es bis zu der in 50 mm Höhe angebrachten Markierung auf. Auf diese Weise lassen sich mit 4,5 ml Fibrinogenlösung 10 Röhrchen blasenfrei füllen. Nach einstündiger senkrechter Lagerung der Röhrchen bei Raumtemperatur ist das Fibrinogen vollständig geronnen. Die Fibrinröhrchen sind gebrauchsfertig und müssen noch am selben Tag verwendet werden.

Testdurchführung

Die fertigen Fibrinröhrchen werden mit je 100 μ l frischer Euglobulinlösung beschickt. Es werden aus jeder Probe Dreifachwerte angesetzt. Das Einfüllen der Testflüssigkeit erfolgt mit einer 100 μ l Eppendorfpipette. Danach verschließt man die Röhrchen mit dickflüssigem Paraffinöl, um ein Verdunsten zu vermeiden und inkubiert sie im Wärmeschrank bei 37° C für 18 Stunden.

Auswertung

Bei seitlicher Beleuchtung sind die lysierten Anteile der Fibrinsäulen gegen einen dunklen Hintergrund gut sichtbar. Die Längen der lysierten Teile werden vom Markierungsring ab mit einem Lineal ausgemessen. Der Mittelwert der Dreifachbestimmungen ist das Endergebnis des Tests. Diese sogenannte Lysehöhe ist ein quantitatives Maß für die lytische Aktivität der Testflüssigkeit.

6. Standardfibrinpapier-Lysebestimmung (Goossens, 14, 15;
Goossens und Walcher, 16)

Prinzip

Tränkt man Chromatographiepapier in einer Rinderfibrinogenlösung und löst durch Zusatz von Thrombin die Gerinnung aus, so lagert sich das gebildete Fibrin gleichmäßig und vollständig an das Papier an. Ein solches Plg-freies Standardfibrinpapier (SFP) kann von der Firma Macherey-Nagel & Co., Düren, bereits fertig im genormten Format bezogen werden. Einen SFP-Streifen inkubiert man nun 20 Stunden bei 37° C in der Testlösung (verdünntes Citratplasma). Einen weiteren Streifen inkubiert man unter gleichen Bedingungen in einer Portion der Testlösung, deren lytische Aktivität durch Trasylol^R vollkommen inhibiert ist (= Normlösung). Nach Ablauf der Inkubationszeit ist - in Abhängigkeit vom lytischen Potential der Testflüssigkeit - auf dem ersten SFP-Streifen nur noch ein Teil des Fibrins vorhanden, während der Fibrinbelag des zweiten Streifens erhalten ist. Diese verbleibenden Fibrinmengen werden erfaßt, indem man die Papiere wie bei der Elektrophorese wässert, mit Amidoschwarz färbt und teilweise wieder entfärbt. Die auf den Papieren verbleibende Farbstoffmenge ist proportional zum Fibrinbelag. Der Farbstoff wird eluiert und seine Konzentration in der Eluationsflüssigkeit photometrisch gemessen. Aus den Extinktionen berechnet man den relativen Anteil des lysierten Fibrins und gibt ihn als Lysequote in % an. Die SFPL wurde in den letzten Jahren standardisiert und teilweise automatisiert (Goossens, 14; Metze und Linke, 45; Rath, 50), so daß in einem Durchgang mehrere Bestimmungen einfach durchgeführt werden können.

Benötigtes Material

- Standardfibrinpapier MN 260 N, Charge 98 (Macherey-Nagel & Co., Düren), Plg-frei, Größe 15 cm²
- Chromatographiepapier MN 260 N, Charge 98 (Macherey-Nagel & Co., Düren), zur Leerwertbestimmung, Größe 15 cm²
- Veronal-Na-HCl-Puffer, 0,05 M, pH 7,3

- Trasylol^R (Bayer), polyvalenter Proteinaseninhibitor, verdünnt mit Aqua bidest. auf 1000 KIE/ml
- Test-Streptokinase (Behringwerke), 5000 IE/Amp., verdünnt mit physiol. Kochsalzlösung auf 50 IE/ml
- 0,1 n NaOH
- Aqua bidest.
- Amidoschwarzlösung 10 B (Merck)
- Elphorentfärber (9 Teile Methanol, 1 Teil Eisessig)
- Inkubationsboxen und Eluationsboxen aus Kunststoff mit je 11 vertikalen Untersuchungskammern
- Papierhalter für vertikale Aufhängung von 11 SFP's
- Heräus-Inkubator, 37° C
- "Lysegerät" für den Färbevorgang, bestehend aus Vorratsbehälter für Aqua bidest., Amidoschwarz und Elphorentfärber mit Schlauchsystem aus Kunststoff
Färbebox mit säurefesten Magnetventilen
Zeitschaltwerk
Elektromotor mit vorgeschaltetem Exzenter (60 rpm, Hub 1,5 cm)
- Halbmikro-Küvetten (Ratiolab^R)
- Photometer "Eppendorf" mit Monochromatfilter (Hg 546 nm)

Testdurchführung

Zunächst werden die vorbereiteten Testlösungen in die Untersuchungskammern der Inkubationsboxen gefüllt. Das Flüssigkeitsendvolumen in jeder Kammer beträgt 8 ml. Als Testmaterial für die SFPL verwendet man Citratplasma in der Verdünnung 1:10. Dieses wird wie unter IV. 2. beschrieben gewonnen und kann bei -30° C für etwa 6 Monate ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden (Beitinger, 4). Für jede Lysequotenbestimmung benötigt man 2 Untersuchungskammern. In die erste pipettiert man 1 ml Citratplasma und 7 ml Veronalpuffer zur Bestimmung des Eigenlysewertes des Plasmas. In die zweite Kammer werden zur Ermittlung des Normwertes 1 ml Citratplasma, 1 ml Trasylol^R-Lösung (1000 KIE/ml) und 6 ml Veronalpuffer gefüllt. Bei zahlreichen Versuchen bestimmen wir zusätzlich die maximale Lysequote nach SK-Aktivierung. Hierzu werden in eine dritte Kammer 1 ml

Citratplasma, 1 ml SK-Lösung (50 IE/ml) und 6 ml Veronalpuffer eingebracht. Auf diese Weise können in den Kammern 1 bis 9 jeder Inkubationsbox 3 verschiedene Plasmen getestet werden. Die Kammern 10 und 11 jeder Box bleiben frei zur Bestimmung des Färbeleerwertes. Nach dem Einpipettieren der Flüssigkeiten werden die Papierhalter mit Fibrin- und Chromatographiepapieren bestückt. Hierzu muß unbedingt eine Pinzette benutzt werden, da die SFP's nicht mit den Fingern berührt werden dürfen. Anschließend setzt man die Papierhalter von oben in die Inkubationsboxen ein. In die gefüllten Kammern ragt nun je ein SFP, in die leeren Kammern 10 und 11 je ein Chromatographiepapier zur Leerwertbestimmung. Die SFP's sind vollständig in die Flüssigkeit eingetaucht. Danach verschließt man die Boxen dicht mit Deckeln und inkubiert den Testansatz 20 Stunden im Wärmeschrank bei 37° C. Das beschriebene Schema für den Testansatz kann je nach Bedarf variiert werden.

Der nach der Inkubation folgende Arbeitsgang ist automatisiert und umfaßt Wässerung, Anfärbung mit Amidoschwarz und teilweise Entfärbung der inkubierten Fibrin- und Chromatographiepapiere. Ein Zeitschaltwerk steuert den Zu- und Ablauf definierter Mengen von Aqua bidest., Amidoschwarz und Elphorentfärber durch säurefeste Magnetventile in zwei offene, parallel geschaltete Färbeboxen. In einem Durchgang können somit zwei Papierhalter bearbeitet werden. Die Flüssigkeiten werden über ein Plastikschlauchsystern aus höher gelagerten Vorratsbehältern zu den Ventilen geführt. Nach Gebrauch fließen sie in einen Sammelkanister ab. Die Papierhalter werden direkt nach Beendigung der Inkubation aus den Inkubationsboxen entnommen und von oben her in die Färbeboxen eingesetzt. Jetzt schwenkt man über jede Färbebox einen an einem Stativ angebrachten Elektromotor mit vorgeschaltetem Exzenter und befestigt daran den Faden des Papierhalters. Bei eingeschaltetem Motor bewirkt die Exzenterumdrehung eine Hub- und Senkbewegung des Papierhalters von 1,5 cm/sec. Die Motoren werden in eine Stellung gebracht, in der die Papiere auch im oberen Umkehrpunkt der Bewegung bei gefüllter Box vollständig in der Flüssigkeit eingetaucht blei-

ben. Anschließend wird das Zeitschaltwerk eingeschaltet. Damit läuft dieser Arbeitsgang in 2 3/4 Stunden vollautomatisch ab.

Eluation und photometrische Auswertung

Nach Beendigung des Färbevorganges trocknet man die Papiere in den Papierhaltern 10 Minuten lang bei 37° C im Wärmeschrank. Während dieser Zeit werden die Eluationsboxen vorbereitet. Diese entsprechen den Inkubationsboxen, die einzelnen Kammern sind jedoch größer dimensioniert. In jede dieser Kammern füllt man 25 ml 0,1 n NaOH. Nach der Trocknung setzt man die Papierhalter in die Eluationsboxen ein, so daß in jede Kammer 1 Papier ragt. Der Eluationsvorgang dauert genau 30 Minuten. Um eine vollständige Ablösung des Farbstoffes zu erreichen, bewegt man den Papierhalter etwa alle 5 Minuten mehrmals auf und ab. Nach 30 Minuten wird der Papierhalter aus den Boxen entnommen. Anschließend pipettiert man je 1 ml der Eluate in Halbmikro-Küvetten und mißt die Extinktion E mit dem "Eppendorf"-Photometer (mit Monochromatfilter 546 nm). Die benützten Boxen und Papierhalter werden sorgfältig gereinigt, mit Aqua bidest. gespült und bei 37° C getrocknet.

Berechnung der Lysequoten

Das Testergebnis der SFPL wird als Lysequote L angegeben. Diese berechnet man nach folgender Formel:

$$L (\%) = 100 - \frac{(E)\text{Eigenlysewert} - (E)\text{Leerwert}}{(E)\text{Normwert} - (E)\text{Leerwert}} \times 100$$

Die Eigenlysewerte erhalten wir aus den Eluat en der SFP's, die mit dem Testplasma inkubiert waren. Die zugehörigen Normwerte stammen von den Eluat en der SFP's, die in inhibiertem Testplasma inkubiert wurden. Wird im Ansatz der SFPL zusätzlich mit SK aktiviert, so setzt man diese aktivierten Lysewerte anstelle der Eigenlysewerte in die obige Formel ein. In jeder Box wird mindestens ein Leerwert mitbestimmt. Fallen zwei Leerwerte pro Box an, so wird gemittelt. Dieser Färbeleerwert dient

zusätzlich als Kontrolle des automatisierten Färbevorganges.

7. Gravimetrische Fibrinogenbestimmung

Prinzip

Citratplasma wird durch Zugabe von CaCl_2 -Lösung zur Gerinnung gebracht. Das entstehende Fibringerinnsel entfernt man mit Hilfe eines Glasstabes aus der Lösung. Nach Waschung und Trocknung wird das Gerinnsel gewogen. Die ermittelte Fibrinmenge entspricht dem Fibrinogengehalt des Plasmas.

Benötigtes Material

- Wasserbad, 37°C
- Heräus-Inkubator, 100°C
- Reagenzgläser, 200 x 10 mm und 100 x 10 mm
- Glasstäbe, 25 cm lang
- CaCl_2 -Lösung, 0,025 mmol/l
- Aceton p. a. (Merck)
- Äther p. a. (Merck)
- Aqua bidest.
- Analysenwaage

Testdurchführung

5 ml frisches Citratplasma (Verdünnung 1:10, Gewinnung siehe IV. 2.) werden in einem Reagenzglas (200 x 10 mm) im Wasserbad bei 37°C 15 Minuten lang vorgewärmt. Anschließend gibt man 5 ml auf 37°C temperierte CaCl_2 -Lösung dazu und mischt den Ansatz durch zweimaliges Kippen ohne Schaumbildung. Danach stellt man einen Glasstab in die Lösung und gibt das Reagenzglas ins Wasserbad zurück. Nach etwa 2 Minuten beginnt man, das sich bildende Fibrin vorsichtig um den Glasstab zu wickeln. Nach 30 Minuten ist die Fibrinbildung abgeschlossen und das Fibrin vollständig um den Stab gewickelt. Jetzt wird der Glasstab mit dem Gerinnsel aus der Lösung genommen und zweimal für je 5 Minuten in Reagenzgläser mit frischem Aqua bidest. ge-

stellt, um die übrigen Plasmaanteile zu entfernen. Anschließend schiebt man das Gerinnsel auf dem Glasstab auf eine Länge von etwa $1/2$ cm zusammen und stellt es nochmals für 10 Minuten in Aqua bidest. Danach wird es zur Austrocknung für 10 Minuten in Aceton und für etwa 5 Sekunden in Äther getaucht. Das Gerinnsel ist jetzt fest, wird vom Glasstab abgestreift, in ein frisches Reagenzglas gegeben und für 24 Stunden bei 100° C im Wärmeschrank getrocknet.

Nach der Trocknung wird die Fibrinmenge abgewogen und die Fibrinogenkonzentration in 100 ml Plasma unter Berücksichtigung der Verdünnung durch Citrat berechnet. Die Normalwerte liegen zwischen 200 und 400 mg/100 ml.

V. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE ZUM METHODENVERGLEICH

1. Vorversuche

Als Lösungsmittel für Fibrinogen zur Herstellung der Fibrinröhrchen des GDT geben YASUKOUCHI und WATANABE (70) 1/15 m Phosphatpuffer pH 7,4 an. Da wir bei unseren Versuchen stets den GDT und die FPM parallel durchführten, sollte getestet werden, ob anstelle des Phosphatpuffers aus Gründen der Material- und Zeitersparnis der Fibrinplattenpuffer für den GDT verwendet werden könnte. Hierzu stellten wir 0,1 %ige Fibrinogenlösungen (Plg-reich und Plg-frei) mit Fibrinplattenpuffer und Phosphatpuffer her und füllten sie wie üblich in die Glasröhrchen. Als Testmaterial verwendeten wir Euglobulinlösungen, die aus zwei frisch entnommenen Citratplasmen hergestellt wurden. Eine Portion der Euglobulinlösungen wurde nativ auf die Fibrinröhrchen pipettiert, der anderen wurde vorher SK zugesetzt (Endkonzentration 5 IE SK/ml). Das Ergebnis des Versuchs zeigt Tabelle 1. Die angegebenen Lysehöhen stellen Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen dar.

Tabelle 1:

	Fibrinplattenpuffer		1/15 m Phosphatpuffer	
	Plg-reich	Plg-frei	Plg-reich	Plg-frei
Plasma I				
Spontanlyse	3,7 mm	4,2 mm	3,5 mm	4,3 mm
SK-aktiviert	10,8 mm	9,5 mm	10,6 mm	9,6 mm
Plasma II				
Spontanlyse	4,8 mm	5,3 mm	4,7 mm	5,0 mm
SK-aktiviert	11,5 mm	9,9 mm	11,7 mm	9,7 mm

Es ergaben sich sowohl bei den spontanen Lysehöhen als auch bei den Lysehöhen nach SK-Aktivierung keine deutlichen Unterschiede zwischen Phosphatpuffer und Fibrinplattenpuffer. Es fiel lediglich auf, daß die Fibrinsäulchen bei Verwendung von Fibrinplattenpuffer eine vermehrte Opaleszenz aufwiesen. Dies ist auf den CaCl_2 -Gehalt des Fibrinplattenpuffers zurückzuführen, da der Zusatz von Calciumverbindungen zur Fibrinogenlösung nach SCHWICK (52) die Opaleszenz von Fibrinplatten verstärkt. Aus diesem Grund und zur Material- bzw. Zeitersparnis stellten wir bei den folgenden Versuchen Fibrinplatten und Fibrinröhrchen aus einer gemeinsamen 0,1 %igen Fibrinogenlösung her, wobei der Fibrinplattenpuffer als Lösungsmittel verwendet wurde.

Zur Erfassung der reinen Plasminaktivität muß das Fibrinsubstrat der FPM, des GDT und der SFPL absolut Plg-frei sein. Um dies zu überprüfen, setzten wir Urokinase in hohen Konzentrationen (5000 IE/ml) ein. Hiermit konnte in keinem der drei Verfahren eine Lyse hervorgerufen werden. Somit war die Reinheit des Plg-freien Fibrinogens der Behringwerke und der SFP's nachgewiesen. Das von uns verwendete Plg-reiche Fibrinogenpräparat der Behringwerke enthält nach BRAKMAN und ASTRUP (6) genügend Plg, um Plasminaktivatoren empfindlich zu messen.

Bei der FPM und dem GDT werden im allgemeinen Euglobulinlösungen als Testmaterial eingesetzt. Um zu testen, ob auch mit Plasma eine Lysemessung möglich ist, setzten wir frisch entnommenes Citratplasma 1:10 ohne und mit Zusatz von SK in die Tests ein. Hierbei konnte jedoch weder mit der FPM noch mit dem GDT eine Fibrinolyse nachgewiesen werden. Nach NILSON (48) soll zwar mit der FPM eine Lysemessung möglich sein, wenn Plasma innerhalb einer halben Stunde nach der Entnahme in den Test eingesetzt wird, jedoch konnten unsere Ergebnisse dies nicht bestätigen.

2. Bestimmung der Variationskoeffizienten der Methoden mit standardisiertem Fibrinsubstrat

a. innerhalb eines Testansatzes

15 ml frisches Citratplasma 1:10 wurden mit 75 µl SK-Lösung (Test-Streptokinase, Behringwerke AG, 100 IE/ml, verdünnt in physiol. Kochsalzlösung) vermischt, so daß die Endkonzentration 5 IE SK/ml betrug. Aus 4 ml des aktivierten Plasmas wurden Euglobuline gefällt und gepoolt für die FPM und den GDT. Jeweils 4 Fibrinplatten und 10 Fibrinröhrchen (Plg-reich und Plg-frei) beschickten wir wie üblich mit der Euglobulinlösung. Den Rest des Plasmas setzten wir in die SFPL ein. Der Testansatz erfolgte in einer Inkubationsbox. In der ersten Kammer wurde der Normwert bestimmt, in den Kammern 2 bis 10 der Eigenlysewert und in der Kammer 11 der Leerwert. die Resultate sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2:

Methode	Meßwerte					$\bar{x}$	s	VK
FPM (Plg-reich) Ø in mm	23,0 29,0	24,0 23,3	24,8 24,5	25,0 24,3	27,4 26,0	25,1	1,86	7,4
FPM (Plg-frei) Ø in mm	25,0 25,5	27,4 26,3	25,0 27,0	25,8 24,3	23,5 22,3	25,2	1,56	6,2
GDT (Plg-reich) Lysehöhe in mm	11,4 12,9	10,4 11,8	13,3 13,5	11,8 10,6	10,2 12,0	11,8	1,18	10
GDT (Plg-frei) Lysehöhe in mm	9,5 8,7	8,7 8,8	10,2 9,7	8,9 10,1	10,5 8,5	9,36	0,73	8,0
SFPL Lysequote in %	54,7 57,6	53,8 58,5	57,8 59,4	59,4 58,3	55,6 -	57,2	2,0	3,6

4 der insgesamt 24 Lysezonen auf den 8 Fibrinplatten konnten nicht ausgemessen werden, da sie zu unregelmäßig geformt waren. Somit ergaben sich für die FPM nur jeweils 10 Werte anstatt 12. Die aus den Meßwerten berechneten VK's sind Maßzahlen für den methodisch bedingten Fehler der einzelnen Verfahren. Die größte Genauigkeit hat die SFPL mit einem VK von 3,6 %. Die FPM (VK = 7,4 % bzw. 6,2 %) und der GDT (VK = 10,0 % bzw. 8,0 %) sind bei diesem Vergleich deutlich schlechter.

b. von Tag zu Tag

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der FPM und des GDT verwendeten wir als Kontrollstandard das lyophilisierte Plg-Präparat der Behringwerke AG. Der Inhalt eines Fläschchens (20 CTA-Einheiten Plg) wurde in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und in Portionen von 1 ml bei -20° C eingefroren. Unter diesen Bedingungen ist die Plg-Lösung nach Angaben des Herstellers für etwa 4 Wochen stabil. Plasma war als Kontrollstandard für diese Versuche ungeeignet, da bei längerer Lagerung Aktivitätsverluste befürchtet werden mußten, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt hätte. Die lytische Aktivität des Kontrollstandards wurde an 10 Versuchstagen mit der FPM und dem GDT bestimmt. Jeweils vor Versuchsbeginn wurde eine Portion der Plg-Lösung aufgetaut und mit 20 µl SK-Lösung (1000 IE/ml) vermischt. Sodann wurden jeweils eine Fibrinplatte und drei Fibrinröhrchen (Plg-reich und -frei) beschickt. Die Meßwerte sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Für die FPM ergaben sich als Maß für die Reproduzierbarkeit VK's von 10,2 % bzw. 12,0 %, für den GDT VK's von 11,0 % bzw. 14,0 %. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß bei Messung der lytischen Aktivität von Plasma durch die jeweilige Euglobulinfällung zusätzliche Fehlerquellen hinzukommen. Der VK der SFPL beträgt nach THYM (58) 5 %. Die SFPL ist somit auch in Bezug auf die Reproduzierbarkeit besser als die FPM und der GDT.

Tabelle 3:

Methode	Meßwerte					$\bar{x}$	s	VK
FPM (Plg-reich) Ø in mm	22,0 27,4	24,5 26,1	28,1 29,0	25,8 22,5	21,5 25,4	25,2	2,59	10,2
FPM (Plg-frei) Ø in mm	21,3 27,0	23,6 21,2	26,4 20,0	19,9 25,8	23,1 20,4	22,9	2,73	12,0
GDT (Plg-reich) Lysehöhe in mm	11,5 12,0	15,5 13,0	11,2 11,5	12,2 12,8	11,0 11,0	12,2	1,36	11,0
GDT (Plg-frei) Lysehöhe in mm	7,5 9,5	7,0 7,0	7,0 7,5	9,5 8,0	9,8 8,5	8,1	1,12	14,0

3. Bestimmung des Variationskoeffizienten der Euglobulinlysezeit

Zur Bestimmung des VK der ELT wurden einem Probanden 30 ml Citratblut 1:10 abgenommen, 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und das Plasma abpipettiert. 15 ml des so gewonnenen Plasmas wurden mit 75 µl SK-Lösung (1000 IE SK/ml, verdünnt in physiol. Kochsalzlösung) vermischt, so daß die Endkonzentration 5 IE/ml betrug. Anschließend führten wir die ELT-Bestimmung zwölfmal hintereinander durch. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4. Es ergab sich eine mittlere ELT von 67,5 Minuten bei einer Standardabweichung von 3,98 Minuten. Der VK betrug 5,8 %.

Tabelle 4:

Meßwerte in Minuten	$\bar{x}$	s	VK
65 70 70 65 65 70	67,5	3,98	5,8
65 75 65 70 60 70			

2. Streptokinase-Aktivierungsreihe

Zur Untersuchung des Verhaltens der Methoden mit standardisiertem Fibrinsubstrat und der ELT bei zunehmender SK-Konzentration im Testplasma erstellten wir eine SK-Aktivierungsreihe. Hierzu wurden einem Probanden 100 ml Citratblut 1:10 abgenommen. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 3000 rpm verblieben etwa 50 ml Plasma, die in 9 Portionen à 5 ml aufgeteilt wurden. Der Rest wurde verworfen. Anschließend setzten wir einer Portion 100 μ l physiol. Kochsalzlösung, den restlichen Portionen je 100 μ l SK-Lösung (Test-Streptokinase, Behringwerke AG, verdünnt in physiol. Kochsalzlösung) in steigender Konzentration zu, so daß die Endkonzentrationen 2, 4, 6, 8, 10, 20, 50 und 100 IE SK/ml betrugen. Nach sorgfältigem Mischen wurden die Plasmen in die einzelnen Fibrinolyse-tests eingesetzt. Zunächst führten wir die Euglobulinfällungen durch, erstellten die Ansätze zur ELT-Bestimmung und beschickten die Fibrinplatten bzw. Fibrinröhrchen. Der Rest der Plasmen wurde während dieser Zeit bei 4° C gelagert und nach etwa einer Stunde in die Inkubationsboxen der SFPL pipettiert. Der Ansatz erfolgte in zwei Boxen, wobei für jede Aktivierungsstufe zwei Kammern benötigt wurden (Eigenlysewert und Normwert). Die Ergebnisse des Versuches sind in Tabelle 5 und in den Abbildungen 1, 2 und 3 dargestellt.

Die ELT wurde mit steigender SK-Konzentration von 3 1/2 Stunden auf wenige Minuten verkürzt. Bereits ab einer Konzentration von 10 IE SK/ml konnte die Euglobulinlösung durch Thrombin nicht mehr zur sichtbaren Gerinnung gebracht werden. Bei der Messung der Fibrinolyseaktivatoren auf Plg-reichem Fibrinsubstrat zeigte sich sowohl bei der FPM als auch beim GDT ein linearer Anstieg der Lyse bis zu etwa 10 IE SK/ml. Im weiteren Verlauf flachten die Kurven ab und gingen bei 80 bis 100 IE SK/ml in ein Plateau über (siehe Abbildungen 1 und 2). Die Messung der reinen Plasminwirkung mit Plg-freiem Fibrinsubstrat ergab bei der FPM, dem GDT und der SFPL ein Aktivitätsmaximum bei 2 IE SK/ml Plasma. Bei höheren SK-Kon-

Tabelle 5: Streptokinase-Aktivierungsreihe

SK-Konz. IE/ml Methode	0	2	4	6	8	10	20	50	100
ELT in Minuten	330	30	25	12	5	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
FPM (Plg-reich) Ø in mm	9,5	11,0	15,3	17,0	20,3	23,8	25,6	31,9	33,2
FPM (Plg-frei) Ø in mm	7,5	20,9	20,4	18,3	18,0	17,5	16,8	13,6	12,8
GDT (Plg-reich) Lysehöhe in mm	4,5	10,4	13,1	14,1	15,8	18,0	19,5	24,5	28,3
GDT (Plg-frei) Lysehöhe in mm	4,1	12,8	12,3	10,1	9,6	8,7	7,6	5,0	4,3
SFPL Lysequote in %	4,0	49,3	47,6	42,8	36,4	33,9	27,3	26,3	22,5

n.g. = nicht geronnen

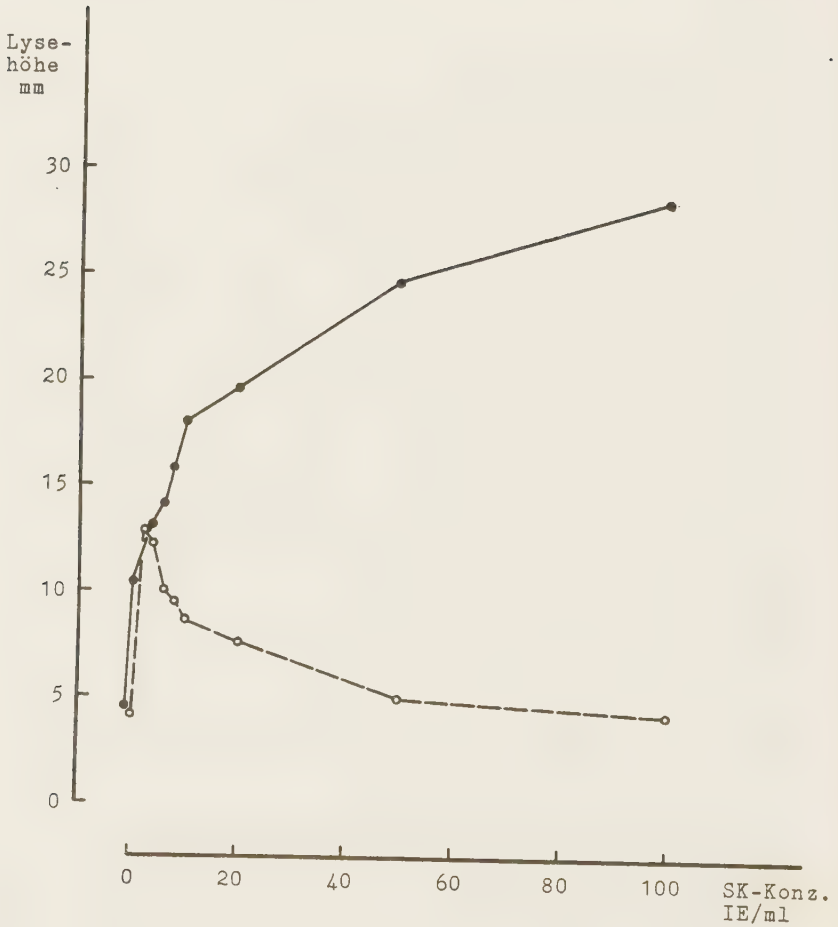


Abbildung 1: SK-Aktivierungsreihe; Ergebnisse des GDT
(Lysehöhe in mm)

- — ● Plg-reiches Fibrinsubstrat
- — ○ Plg-freies Fibrinsubstrat

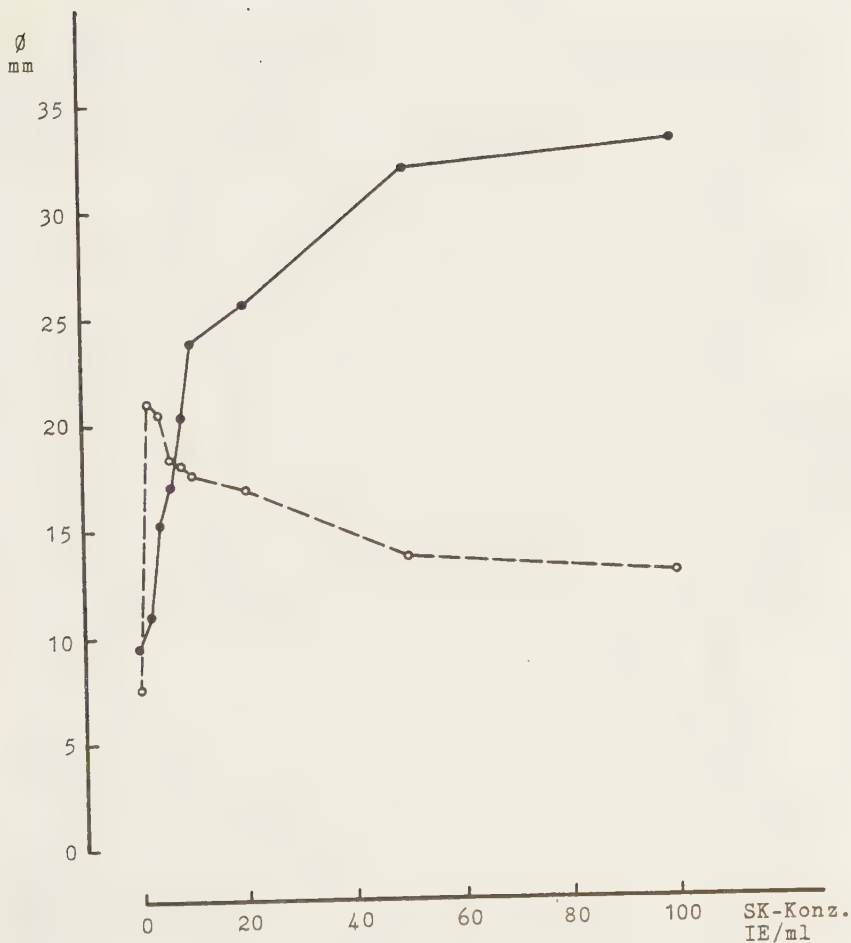


Abbildung 2: SK-Aktivierungsreihe; Ergebnisse der FPM
(Lysezonendurchmesser in mm)

● — ● Plg-reiches Fibrinsubstrat

○ — ○ Plg-freies Fibrinsubstrat

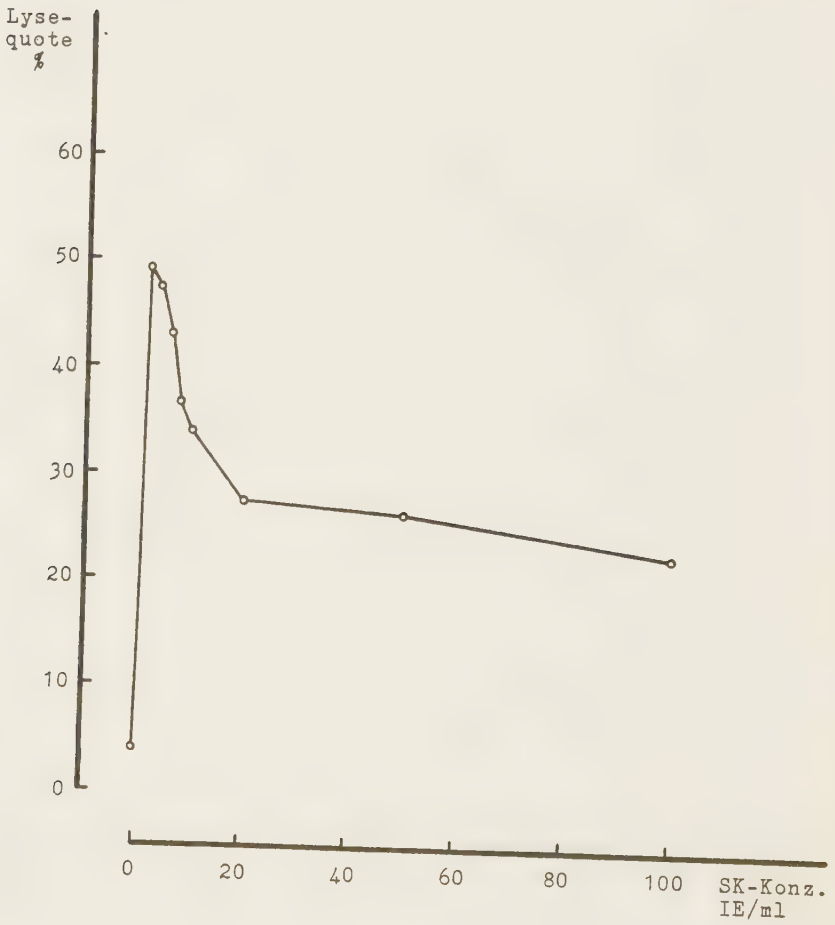


Abbildung 3: SK-Aktivierungsreihe; Ergebnisse der SFPL
(Lysequote in %)

Plg-freies Fibrinsubstrat

zentrationen beobachteten wir eine Abnahme der Plasminaktivität. Die Kurven näherten sich ab etwa 50 IE SK/ml asymptotisch einem Endwert, der jedoch höher lag als der Spontanlysewert ohne SK-Zusatz (siehe Abbildungen 1, 2 und 3). Diese Resultate stimmen nicht mit den Ergebnissen von THYM (58) mit der SFPL überein. Er fand das Maximum der lytischen Aktivität bei 50 IE SK/ml im Ansatz der SFPL. Mit 100 IE SK/ml konnte die Lyse nicht weiter gesteigert werden, teilweise wurde sogar ein leichter Abfall beobachtet. THYM füllte bei seinen Versuchen die SK-Lösung direkt in die Boxen der SFPL ein wie es auch in dieser Arbeit unter IV. 6. beschrieben wurde. Somit befanden sich 1 ml Plasma und 50 IE SK durch die Verdünnung mit Veronal-HCl-Puffer in einem Gesamtvolumen von 8 ml. Bei unseren Versuchen hingegen wurde die SK etwa 1 Stunde vor Inkubationsbeginn dem Plasma zugesetzt. Ferner benützte THYM zur Normwertbestimmung Plasma ohne SK-Zusatz, während wir aus jeder Aktivierungsstufe einen eigenen Normwert zur Lyseberechnung bestimmten. Um zu überprüfen, ob die Diskrepanzen auf diesen unterschiedlichen Ansätzen beruhen, führten wir den folgenden Nachversuch durch.

5. Nachversuch

Einem Probanden wurden 80 ml Citratblut 1:10 abgenommen. 20 ml des abzentrifugierten Plasmas wurden bei 4° C gelagert. Den Rest verwendeten wir für den ersten Testansatz, in dem die SK wie von THYM angegeben direkt in den Inkubationsboxen der SFPL zugesetzt wurde. Die eingesetzten Mengen an SK betrugen 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 50 und 100 IE SK/Kammer. In den Kammern zur Normwertbestimmung befand sich keine SK. Die Inkubationsboxen für den zweiten Testansatz wurden nach drei Stunden gefüllt. Eine Stunde vorher war das bei 4° C aufbewahrte Plasma in 9 Portionen aufgeteilt und jeder Portion 100 µl SK-Lösung bzw. Kochsalzlösung zugesetzt worden. Die Endkonzentrationen betrugen 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 50 und 100 IE SK/ml Plasma. Danach waren die Plasmen wieder in den Kühlschrank gestellt worden. Durch die dreistündige Lagerung bei

4° C sind nach THYM keine Aktivitätsverluste zu befürchten. Der zweite Testansatz entsprach dem im vorigen Abschnitt beschriebenen. Die Ergebnisse des Nachversuchs sind in Tabelle 6 und Abbildung 4 dargestellt.

Tabelle 6:

SK (IE)		Testansatz I		Testansatz II	
		E-Lw	Lysequote	E-Lw	Lysequote
0	EL	485	9,5 %	482	9,4 %
	N	536		532	
2	EL	382	28,8 %	274	51,2 %
	N	537		562	
4	EL	359	32,8 %	302	48,1 %
	N	535		582	
6	EL	306	40,4 %	314	45,8 %
	N	514		580	
8	EL	301	44,6 %	322	43,9 %
	N	543		574	
10	EL	294	48,8 %	325	39,4 %
	N	575		537	
20	EL	254	53,3 %	348	34,4 %
	N	544		531	
50	EL	240	56,4 %	359	31,4 %
	N	551		524	
100	EL	253	53,1 %	379	29,8 %
	N	540		540	

EL = Eigenlysewert

N = Normwert

E - Lw = Extinktion abzüglich des Leerwertes

Die absolute Menge an SK pro ml Plasma war bei beiden Versuchen gleich. Setzt man die SK im Ansatz der SFPL zu, so findet man das Maximum der Lyse bei 50 IE SK. Das Resultat bei SK-Zusatz zum Plasma 1 Stunde vor Inkubationsbeginn war identisch mit den Ergebnissen des vorigen Abschnitts. Die Normwerte wurden durch diese unterschiedlichen Versuchsansätze nicht beeinflusst, wie man aus Tabelle 6 ansehen kann.

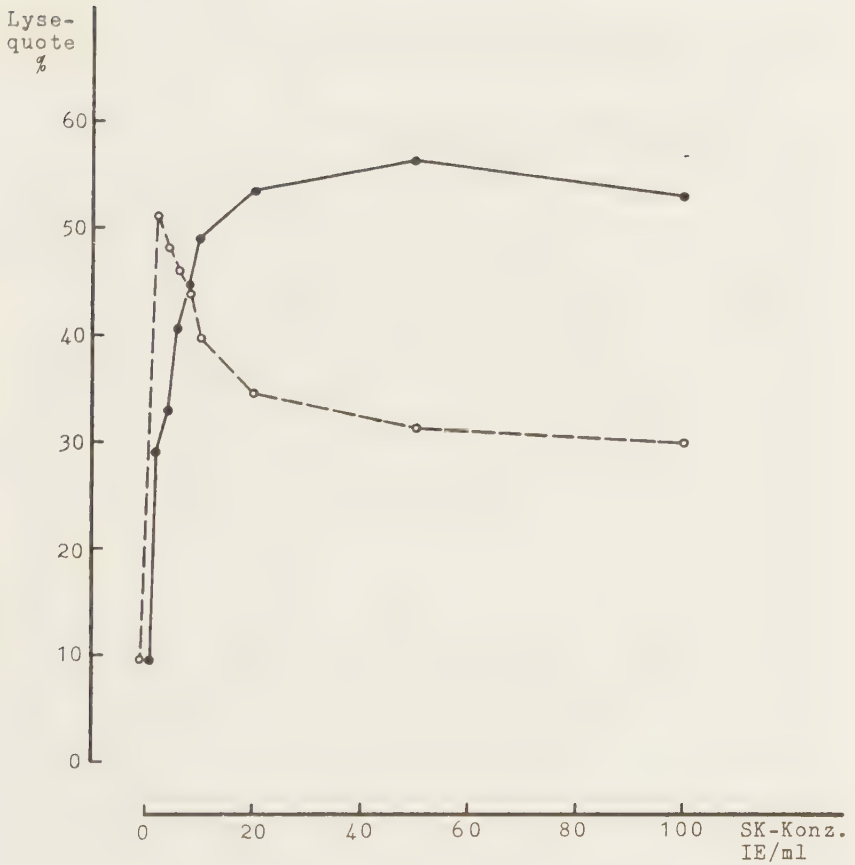


Abbildung 4: Nachversuch zur SK-Aktivierung in vitro
Ergebnisse der SFPL (Lysequote in %)

- SK-Zusatz in den Inkubationskammern der SFPL
- SK-Zusatz ins Plasma 1 Stunde vor Inkubationsbeginn

6. Untersuchung der Fibrinolyse bei Probanden

a. Versuchsdurchführung und Ergebnisse

An einem Kollektiv von 10 klinisch gesunden Probanden untersuchten wir die spontane fibrinolytische Aktivität mit den im Versuchsprogramm genannten Methoden. An jedem Versuchstag wurden einem Probanden 3 ml Vollblut und 30 ml Citratblut 1:10 abgenommen. Das Vollblut wurde sofort nach der Entnahme in Glasröhrchen pipettiert und diese zur Bestimmung der VLZ in ein Wasserbad von 37° C gestellt. 4 ml des abzentrifugierten Plasmas wurden bei -20° C eingefroren für die SFPL, die wir zu einem späteren Zeitpunkt durchführten. Den Rest des Plasmas verwendeten wir für die ELT, die FPM, den GDT und den SCT. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Bei der Bestimmung der VLZ war nach 24 Stunden bei keinem der Probanden eine vollständige Lyse zu beobachten. Die Gerinnsel waren deutlich verkleinert, was jedoch auch teilweise auf Retraktionsvorgänge zurückzuführen war. Die ELT's lagen bei allen Probanden mit Ausnahme von Nr. X oberhalb der von CONRAD (11) angegebenen Normgrenze von 3 Stunden. Die Konzentrationen an FSP waren in allen untersuchten Seren niedriger als die untere Nachweisgrenze der von uns angewandten Modifikation des SCT. Aus den Meßwerten der Verfahren mit standardisiertem Fibrinsubstrat lassen sich Normbereiche angeben, die dem + 2s-Bereich entsprechen:

FPM (Plg-reich)	Ø	7,3 - 12,1 mm
FPM (Plg-frei)	Ø	6,5 - 13,7 mm
GDT (Plg-reich)	Lysehöhe	2,2 - 7,1 mm
GDT (Plg-frei)	Lysehöhe	1,7 - 8,5 mm
SFPL	Lysequote	2,8 - 20,5 %

Die Werte des Probanden X lagen alle außerhalb der Norm. Auch

Tabelle 7: Untersuchung der Fibrinolyse bei Probanden

Proband Methode	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	$\bar{x}$	s	VK
VLZ in Stunden	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	-	-	-
ELT in Minuten	280	340	240	290	270	420	210	225	300	120	269,5	80,15	29,7 %
SCT FSP in µg/ml	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	-	-	-
FPM (Plg-reich) Ø in mm	8,4	9,7	10,6	9,4	8,9	8,8	10,0	9,7	8,8	12,5	9,68	1,19	12,3 %
FPM (Plg-frei) Ø in mm	9,0	8,3	10,3	7,5	9,5	11,7	10,3	9,8	10,3	14,0	10,07	1,81	18,0 %
GDT (Plg-reich) Lysehöhe in mm	3,9	4,0	5,0	4,6	3,4	3,4	5,5	4,9	4,3	7,5	4,65	1,21	26,0 %
GDT (Plg-reich) Lysehöhe in mm	3,6	3,6	5,3	3,3	4,2	6,9	5,9	4,7	4,9	8,8	5,12	1,71	33,4 %
SFPL Eigenlyse in %	9,0	9,6	13,6	5,8	9,2	13,9	12,3	10,0	10,9	22,2	11,65	4,41	38,0 %
akt. Lyse	52,9	46,6	45,7	48,6	48,4	54,0	41,7	50,5	50,0	36,1	47,45	5,34	11,2 %

akt. Lyse = Zusatz von 50 IE SK im Ansatz der SFPL

die ELT war deutlich verkürzt. Eine Ursache für diese gesteigerte Fibrinolyse konnte jedoch nicht gefunden werden.

b. Empfindlichkeit der Methoden mit standardisiertem Fibrin-substrat

Die Streubreiten der Meßwerte der Verfahren mit standardisiertem Fibrinsubstrat, ausgedrückt durch die VK's, spiegeln die interindividuelle Streuung der spontanen fibrinolytischen Aktivität wider. Wie man aus Tabelle 7 ersieht, waren die VK's bei den einzelnen Verfahren unterschiedlich groß, das heißt, die verschiedenen Meßverfahren erfaßten die interindividuelle Schwankungsbreite unterschiedlich empfindlich. Zur genaueren Beurteilung der Empfindlichkeit muß jedoch auch die jeweilige methodisch bedingte Streuung der Meßwerte, die in den vorherigen Abschnitten ermittelt wurde, berücksichtigt werden. In der folgenden Tabelle sind diese Größen zusammengefaßt:

Tabelle 8:

	VK Genauigkeit	VK Reproduzierbarkeit	VK der Meßwerte
FPM (Plg-reich)	7,4 %	10,2 %	12,3 %
FPM (Plg-frei)	6,2 %	12,0 %	18,0 %
GDT (Plg-reich)	10,0 %	11,0 %	26,0 %
GDT (Plg-frei)	8,0 %	14,0 %	33,4 %
SFPL	3,6 %	5,0 %	38,0 %

Die Meßwerte der SFPL zeigten die größte Streuung bei dem geringsten methodisch bedingten Fehler bzw. bei größter Genauigkeit und Reproduzierbarkeit. Die SFPL ist somit das empfindlichste Meßverfahren bei diesem Vergleich. Die FPM ist in Bezug auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zwar etwas besser als der GDT, jedoch ist sie sehr unempfindlich, da die

Schwankungsbreite der Meßwerte nur wenig über der methodisch bedingten Streubreite liegt. Der GDT nimmt beim Vergleich der Empfindlichkeit eine Mittelstellung ein. Für die ELT ist eine Abschätzung der Empfindlichkeit aus den ermittelten Größen nicht möglich, da die Schwankungsbreite der Lysezeiten zusätzlich noch durch die Höhe der Fibrinogenspiegel in den untersuchten Plasmen beeinflusst wird. Diese Variable wurde jedoch nicht bestimmt.

c. Korrelation der Meßwerte

Um zu überprüfen, inwieweit die Meßwerte der einzelnen Fibrinolysetests miteinander korrelieren, wurden die Korrelationskoeffizienten r berechnet. Diese sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 9:

	FPM (reich)	FPM (frei)	GDT (reich)	GDT (frei)	SFPL	ELT
FPM (reich)	-	0,63	0,92	0,68	0,78	-0,75
FPM (frei)	0,63	-	0,61	0,97	0,96	-0,41
GDT (reich)	0,92	0,61	-	0,66	0,72	-0,85
GDT (frei)	0,68	0,97	0,66	-	0,95	-0,39
SFPL	0,78	0,96	0,72	0,95	-	-0,49
ELT	-0,75	-0,41	-0,85	-0,39	-0,49	-

reich = Plg-reich

frei = Plg-frei

Die Meßwerte der Methoden mit standardisiertem Fibrinsubstrat (Plg-frei) zeigten eine hohe positive Korrelation. Auch bei

der Messung der Aktivatoren ergab sich eine ausgezeichnete Übereinstimmung zwischen FPM und GDT. Die Aktivatoraktivität korrelierte bei unserem Normalkollektiv ebenfalls positiv mit der Aktivität des Plasmins. Die ELT's waren mit den übrigen Meßwerten negativ korreliert, wobei niedrigen Lysezeiten vor allem hohe Aktivatoraktivitäten entsprachen ($r = -0,85$ bzw. $-0,75$). Die Korrelation mit der Plasminaktivität hingegen war weniger gut ($r = -0,41$ bzw. $-0,39$ und $-0,49$).

7. Untersuchung bei Patienten mit therapeutisch aktivierter Fibrinolyse

a. Versuchsdurchführung und Ergebnisse

In Analogie zum vorigen Abschnitt untersuchten wir die Fibrinolyse bei 10 Patienten, die wegen akuter und subakuter arterieller Verschlüsse im femoro-poplitealen Stromgebiet mit der Katheterlyse nach HESS (31) behandelt wurden. Bei diesem Therapieverfahren wird ein Katheter in die A. femoralis in Richtung auf das Strombahnhindernis eingeführt. Durch diesen Katheter werden geringe Dosen SK in den Thrombus infiltriert. Auf diese Weise versucht man, den Thrombus zu lysieren und den Katheter schließlich so weit vorzuschieben, bis Anschluß an ein offenes Gefäß gefunden ist. Insgesamt werden etwa 70000 IE SK verabreicht. Diese relativ geringe Dosis ist empirisch und soll die systemische Fibrinolyse nur so weit aktivieren, daß in die Peripherie verschlepptes Thrombenmaterial lysiert, und eine sofortige Rethrombosierung verhindert wird. Bei allen 10 von uns untersuchten Patienten war die Lysebehandlung primär erfolgreich, und das Obturat konnte beseitigt werden. Die Behandlungsdauer betrug zwischen 1 und 4 Stunden. Direkt im Anschluß an die Lyse entnahmen wir jedem Patienten 3 ml Vollblut und 30 ml Citratblut 1:10 aus dem Katheter. Mit dem gewonnenen Material führten wir dieselben Untersuchungen durch wie im vo-

rigen Abschnitt. Die Testergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Die VLZ waren gegenüber denen des Normalkollektivs deutlich verkürzt, so daß in jedem Fall eine erhöhte Fibrinolyse nachgewiesen werden konnte. Bei den Patienten V und VIII kam es nicht mehr zur spontanen Gerinnselbildung. Die ELT's waren ebenfalls sehr stark verkürzt und lagen im Bereich von 10 - 105 Minuten. Bei drei Patienten (V, VII und VIII) konnte die Euglobulinlösung durch Thrombin nicht mehr zur Gerinnung gebracht werden. Die Untersuchung auf FSP ergab Werte zwischen 25 und 125 ug/ml. Bei dem Patienten I konnten trotz erfolgreicher Katheterlyse und zweifacher Wiederholung der Bestimmung keine FSP nachgewiesen werden. Die Blutentnahme erfolgte bei diesem Patienten 2 Stunden nach Lysebeginn.

Die Meßwerte der Methoden mit standardisiertem Fibrinsubstrat waren gegenüber denen des Probandenkollektivs alle deutlich erhöht. Die Faktoren, um die die Patientenwerte im Mittel größer waren als die Probandenwerte, betrugen für die SFPL 3,8, die FPM (Plg-frei) 1,9 und den GDT (Plg-frei) 1,7. Da mit jeder Methode die freie Plasminaktivität gemessen wurde, sind diese Faktoren vergleichbar. Bei der SFPL lagen die Patienten- und Probandenwerte am weitesten auseinander, so daß hier am besten zwischen spontaner und aktivierter Fibrinolyse unterschieden werden konnte. Die FPM und vor allem der GDT sind in dieser Beziehung wesentlich schlechter. Vergleicht man die bei den Patienten gemessenen Werte mit den Kurven der SK-Aktivierungsreihe, so liegen sie in einem Bereich, der einer in vitro Aktivierung mit ungefähr 5-15 IE SK/ml Plasma entspricht. Das in vitro festgestellte Maximum der freien Plasminaktivität war somit bereits überschritten zugunsten einer vermehrten Bildung von Proaktivator-Plg-SK-Komplexen mit Aktivatoraktivität. Dies erklärt auch, wieso sich bei der SFPL nach weiterer Zugabe von 50 IE SK im Ansatz eine niedrigere mittlere Lysequote von 38,31 % ergab im Vergleich zur mittleren Eigenlysequote der Patientenplasmen von 43,98 %. Die maximale Aktivatoraktivität wird

Tabelle 10: Untersuchung von Patienten mit therapeutisch aktivierter Fibrinolyse

Patient Methode	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	$\bar{x}$	s	VK
VLZ in Stunden	14	15	14	12	n.g.	18	5	n.g.	16	10	-	-	-
ELT in Minuten	25	30	15	10	n.g.	105	n.g.	n.g.	35	20	-	-	-
SCT FSP in µg/ml	25	75	125	100	25	50	100	75	100	50	-	-	-
FPM (Plg-reich) Ø in mm	25,2	26,3	29,0	26,5	27,3	20,3	25,9	26,8	24,5	25,6	25,74	2,27	8,8 %
FPM (Plg-frei) Ø in mm	20,4	21,0	16,6	19,8	17,9	21,8	20,4	19,1	20,8	18,5	19,63	1,59	8,1 %
GDT (Plg-reich) Lysehöhe in mm	12,8	13,4	17,1	15,3	10,7	10,3	12,3	15,1	10,6	14,2	13,18	2,27	17,2 %
GDT (Plg-frei) Lysehöhe in mm	11,5	9,3	8,3	8,8	8,1	9,2	9,4	7,8	9,0	8,1	8,95	1,06	11,8 %
SFPL Eigenlyse in %	57,0	51,7	38,3	39,6	39,3	41,2	47,1	30,7	51,7	43,2	43,98	7,86	17,9 %
akt. Lyse	48,3	39,8	24,6	33,7	30,0	49,3	48,7	18,6	53,6	36,5	38,31	11,71	30,6 %

n. g. = nicht geronnen

akt. Lyse = Zusatz von 50 IE SK im Ansatz der SFPL

nach unseren Ergebnissen mit der FPM und dem GDT (Plg-reich) durch die bei der Katheterlyse verabreichte SK-Dosis nicht erreicht.

b. Korrelation der Meßwerte

Die Korrelationskoeffizienten für die Meßwerte der einzelnen Fibrinolysetests bei Patienten mit aktivierter Fibrinolyse sind in Tabelle 11 zusammengefaßt. Bei der Berechnung der Korrelationskoeffizienten wurden bei den Patienten, bei denen die Euglobulinlösung ungerinnbar war, ELT's von null eingesetzt. Ebenso wurde bei dem Patienten I ein FSP-Spiegel von null angenommen.

Tabelle 11:

	FPM (reich)	FPM (frei)	GDT (reich)	GDT (frei)	SFPL	ELT
FPM (reich)	-	-0,78	0,67	-0,33	-0,25	-0,87
FPM (frei)	-0,78	-	-0,59	0,55	0,52	0,58
GDT (reich)	0,67	-0,59	-	-0,27	-0,40	-0,46
GDT (frei)	-0,33	0,55	-0,27	-	0,82	0,25
SFPL	-0,25	0,52	-0,40	0,82	-	0,17
ELT	-0,87	0,58	-0,46	0,25	0,17	-
SCT	0,32	-0,17	0,46	-0,42	-0,28	-0,18

reich = Plg-reich

frei = Plg-frei

Die Meßwerte der SFPL, des GDT und der FPM (Plg-frei) zeigten eine ausgezeichnete positive Korrelation, die jedoch nicht

mehr so hoch war, wie bei den Werten des Probandenkollektivs. Auch bei der Messung der Aktivatoren ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen FPM und GDT. Während jedoch bei den Probanden stets eine positive Korrelation zwischen Aktivator- und Plasminaktivität bestand, waren diese Größen hier schwach negativ korreliert. Dies erklärt sich dadurch, daß das Maximum der Plasminaktivität durch die SK-Aktivierung bereits überschritten war und sich somit bei hohen Aktivatoraktivitäten niedrige Plasminaktivitäten ergaben (siehe V. 4.: SK-Aktivierungsreihe). Aus diesem Grunde waren auch die ELT's nicht mehr negativ mit den Ergebnissen der Lysemessung auf Plg-freiem Fibrinsubstrat korreliert. Zwischen den Aktivatoren und den ELT's ergab sich eine gute negative Korrelation. Die mit dem SCT gemessenen FSP-Spiegel korrelierten nur wenig mit den Meßwerten der übrigen Fibrinolysetests.

VI. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE ZUR BEEINFLUSSUNG DER FIBRINOLYSE DURCH NATRIUM-PENTOSANPOLYSULFAT

1. In vitro Versuche mit der SFPL

a. Vorbereitungen

Als Testlösungen für die in vitro Experimente verwendeten wir Plg-Lösung und Citratplasma. Die Plg-Lösung wurde aus Test-Plg der Behringwerke AG hergestellt. Wir lösten den Inhalt eines Fläschchens jeweils vor Testbeginn in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung auf und verdünnten anschließend auf eine Konzentration von 2 CTA-Einheiten Plg/ml. Für die Untersuchungen mit Plasma wurden jeweils kurz vor Inkubationsbeginn einem Probanden 40 ml Citratblut 1:10 abgenommen und 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Für einen Testansatz benötigten wir 18 ml Citratplasma bzw. Plg-Lösung.

NPP sollte den Testlösungen in Endkonzentrationen von 10, 25, 50 und 100 µg/ml zugesetzt werden. Da das Flüssigkeitsvolumen in jeder Inkubationskammer 8 ml beträgt, mußten Lösungen mit 80, 200, 400 und 800 µg NPP/ml hergestellt werden. Wir verwendeten das Präparat SP 54^R der Firma Benechemie, das in Ampullen à 100 mg in 1 ml Lösung geliefert wird. Die entsprechenden Verdünnungen wurden jeweils vor Versuchsbeginn mit 0,05 M Veronal-HCl-Puffer pH 7,3 hergestellt.

Zur SK-Aktivierung benützten wir wie üblich in physiologischer Kochsalzlösung verdünnte Test-SK der Behringwerke AG (50 IE/ml), zur Normwertbestimmung Trasylol^R, das mit Aqua bidest. auf 1000 IE/ml verdünnt wurde.

b. Testansatz

Die Experimente mit Plg-Lösung und Citratplasma wurden jeweils dreifach durchgeführt. Für einen Ansatz standen zwei Inkubationsboxen mit je 11 Kammern zur Verfügung. In Box I bestimmten wir die Lysequoten der Testlösungen ohne und mit Zusatz von NPP in Konzentrationen von 10 und 25 µg/ml, in Box II mit Zusatz von 50 und 100 µg/ml. Für jede Bestimmung benötig-

ten wir drei Kammern (Eigenlysewert, Normwert, SK-aktierte Lyse), somit neun Kammern in Box I und sechs Kammern in Box II. Die Kammern 10 und 11 jeder Box blieben frei zur Leerwertbestimmung; 7, 8 und 9 der Box II wurden nicht benutzt. Vor dem Einpipettieren bestückten wir die Papierhalter mit den Fibrin- und Chromatographiepapieren. Das Einfüllen der vorbereiteten Lösungen in die Boxen erfolgte nach dem in Abbildung 5 dargestellten Schema in der Reihenfolge von unten nach oben.

Abb. 5:

		0			50			25			$\mu\text{g NPP/ml}$	
Box I		50			100			-			$\mu\text{g NPP/ml}$	
Box II												
8		Pl	Pl	Pl	Pl	Pl	Pl	Pl	Pl			
7		NPP	NPP	NPP	NPP	NPP	NPP	NPP	NPP			
6			T	SK		T	SK		T	SK		
5												
4		P	P	P	P	P	P	P	P		L	L
3												
2												
Flüssigkeitsmenge in ml												
Kammer		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Legende:

- P = Puffer (Veronal-HCl-Puffer, 0,05 m, pH 7,3)
T = Trasylol^R-Lösung, 1000 IE/ml
SK = SK-Lösung, 50 IE/ml
Pl = Plasma bzw. Plg-Lösung, 2 CTA-Einheiten/ml
L = Leerwert, keine Reagentien in der Kammer
NPP = Natrium-Pentosanpolysulfat-Lösung; die Endkonzentrationen in den Boxen I und II sind oben angegeben

Nach dem Einpipettieren der Flüssigkeiten setzen wir die Papierhalter in die Boxen ein, so daß in die Kammern 1 bis 9

Fibrinpapiere und in die Kammern 10 und 11 Chromatographiepapiere ragten. Anschließend wurden die Boxen verschlossen und 20 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Restfibrin wie üblich bestimmt und die Lysequoten berechnet.

c. Ergebnisse

Die Extinktionswerte und Lysequoten der in vitro Experimente mit NPP sind für die Plg-Lösungen in den Abbildungen 6 und 7, für Citratplasma in den Abbildungen 8 und 9 graphisch dargestellt. Es wurden aus jeweils drei Ansätzen die Mittelwerte $\bar{x}$ und die Standardabweichungen s berechnet.

Die Spontanlysequote und die SK-aktivierte Lysequote der Plg-Lösung blieben nach Zugabe von NPP unverändert. Bei Einsatz von Plasma zeigte sich im Mittel ein leichter Anstieg von 10,6 % auf 14,5 % bei 100 µg NPP/ml. Die Lysequoten der Plasmen nach SK-Aktivierung stiegen im Mittel von 46 % ohne NPP auf 52 % bei 10 µg NPP/ml an, um bei höheren NPP-Konzentrationen wieder auf den Ausgangswert abzufallen. Die hiermit festgestellten Veränderungen nach NPP-Zugabe liegen allerdings im Streubereich der Meßwerte und lassen nach unserer Meinung keinen Schluß zu auf eine Aktivierung der Fibrinolyse in vitro durch NPP. Bei der Betrachtung der gemessenen Extinktionswerte fiel uns jedoch auf, daß diese stets mit zunehmender NPP-Konzentration abfielen (siehe Abb. 6 und 8). Auf dieses Phänomen wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

2. Natrium-Pentosanpolysulfat und Heparin als Störfaktoren der Elektrophoresefärbung

Aufgrund des Verhaltens der Extinktionswerte nach Zugabe von NPP vermuteten wir einen unspezifischen Einfluß auf den Testablauf der SFPL. Da alle drei Extinktionskurven (Spontanlyse, Normwert, aktivierte Lyse) einen analogen Verlauf zeigten, war ein spezifischer Effekt auf die beteiligten Enzyme nicht anzunehmen. Um dies zu überprüfen, sollte NPP ohne sonstige Zusätze in den Testansatz der SFPL eingebracht werden. Hepa-

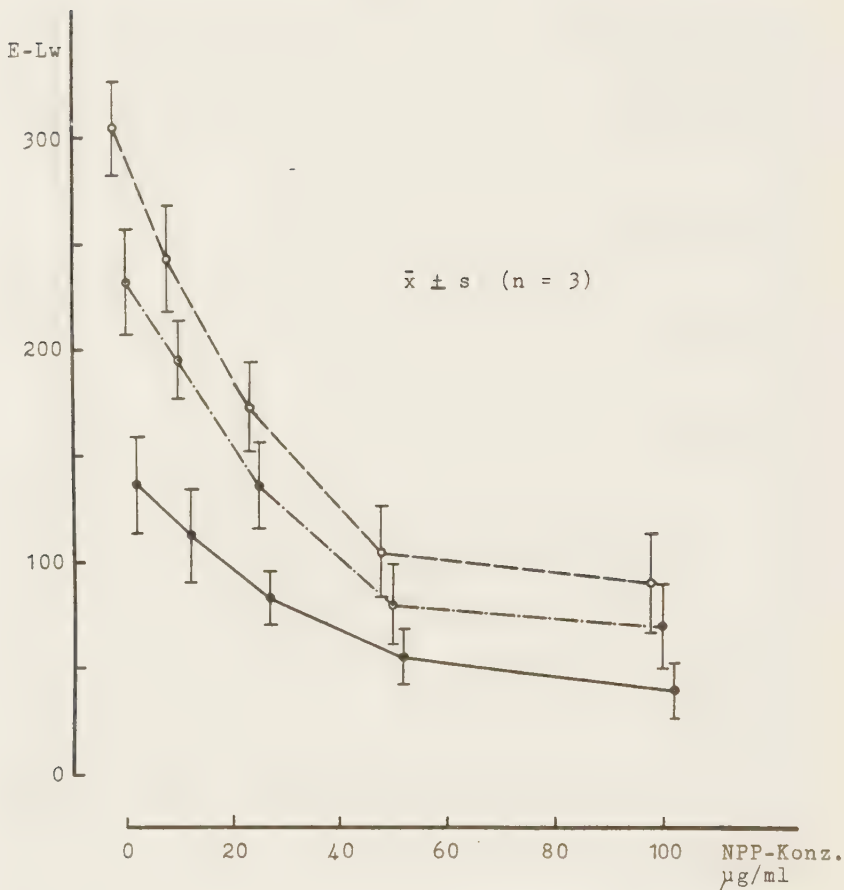


Abbildung 6: In vitro Versuche mit der SFPL zum Einfluß von NPP auf die Fibrinolyse
 Testlösung: Plg-Lösung
 E-Lw = Extinktionswert abzüglich Leerwert

○ — — — ○ Eigenlysewerte

○ — — — ○ Normwerte

● — — — ● SK-aktivierte Lysewerte

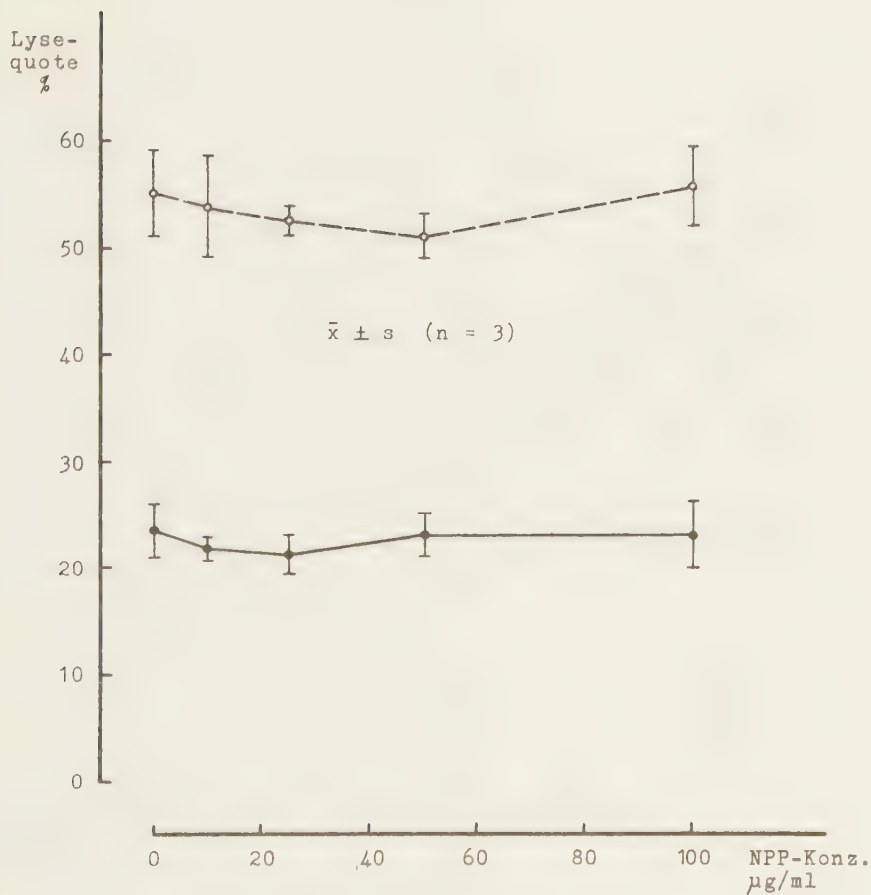


Abbildung 7: In vitro Versuche mit der SFPL zum Einfluß von NPP auf die Fibrinolyse
Testlösung: Plg-Lösung

● — ● Eigenlyse
○ — — ○ SK-aktivierte Lyse

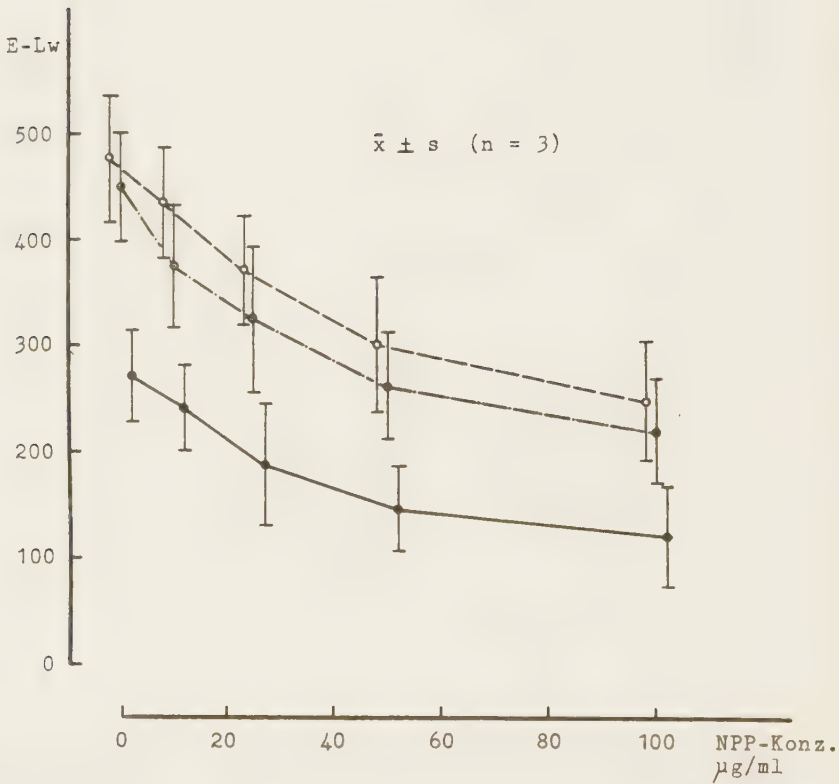


Abbildung 8: In vitro Versuche mit der SFPL zum Einfluß von NPP auf die Fibrinolyse
Testlösung: Citratplasma
E-Lw = Extinktionswert abzüglich Leerwert

○—○ Eigenlysewerte

○—○ Normwerte

●—● SK-aktivierte Lysewerte

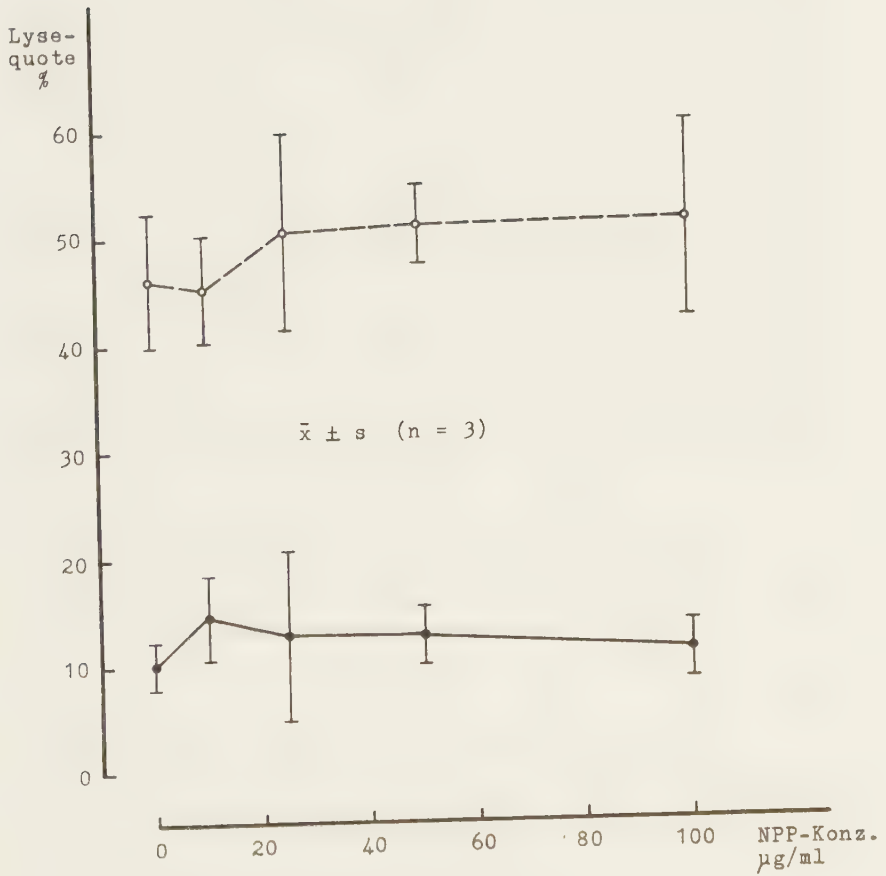


Abbildung 9: In vitro Versuche mit der SFPL zum Einfluß von NPP auf die Fibrinolyse
Testlösung: Citratplasma

● — ● Eigenlyse
○ — ○ SK-aktivierte Lyse

rin ist chemisch eng verwandt mit NPP und wird in der Klinik häufig als Antikoagulans angewandt. Da somit gelegentlich auch heparinhaltiges Plasma mit der SFPL untersucht werden muß, sollte auch der Einfluß dieser Substanz getestet werden. Wir stellten mit Heparin und NPP je eine Verdünnungsreihe her. Verwendet wurde das Präparat Thrombophob^R der Firma Nordmark. Als Lösungsmittel diente Veronal-HCl-Puffer. Die Konzentrationen der NPP-Lösungen betrugen 40, 80, 200, 400 und 800 µg/ml, die der Heparinlösungen 40, 80, 200, 400 und 800 IE/ml. NPP wurde in Box I, Heparin in Box II des SFPL-Ansatzes getestet. Die erste Kammer jeder Box enthielt nur 8 ml Veronal-HCl-Puffer, die Kammern 2-6 jeweils 7 ml Puffer und 1 ml Testlösung in steigender Konzentration. Die restlichen Kammern blieben frei. Nach dem Einpipettieren der Flüssigkeiten wurden die mit Fibrinpapieren (Plätze 1-6) bzw. Chromatographiepapieren (Plätze 10 und 11) bestückten Papierhalter in die Boxen eingesetzt, diese verschlossen und 20 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde der Restfibringehalt wie üblich bestimmt. Tabelle 12 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. Anggeben sind die Extinktionswerte E abzüglich der Färbeleerwerte Lw.

Tabelle 12:

µg NPP/ml bzw. IE Heparin/ml		0	5	10	25	50	100
NPP	E-Lw	235	159	117	69	35	21
Heparin	E-Lw	246	191	165	140	129	111

Die gemessenen Extinktionen nahmen mit steigender NPP-Konzentration bzw. Heparinkonzentration im Inkubationsansatz ab. WACHTER et al. (62) wiesen eine Störung der Eiweißfärbung mit Amidoschwarz durch Elektrolyte nach, wobei alle in höherem Maße wirksamen Verbindungen Sulfate waren. Der Zusatz dieser Elektrolyte zur Entfärbeflüssigkeit (Methanol und Eis-

essig 9:1) ergab erniedrigte Extinktionswerte bei der photometrischen Auswertung. Diese Beobachtungen wurden durch den Nachweis einer gegenseitigen Verdrängung von Elektrolyt und Farbstoff erklärt, da erneutes Einfärben mit Amidoschwarz und Entfärben ohne Elektrolytzusatz normale Extinktionen ergab. NPP und Heparin sind als organische Polyelektrolyte ebenfalls reich an Sulfatresten. Unsere Beobachtungen wären nun dadurch erklärbar, daß sich NPP und Heparin während der Inkubation an den Fibrinbelag der SFP's anlagern und Bindungsstellen für den Farbstoff Amidoschwarz besetzen. Die Bindung der Polyelektrolyte an Fibrin muß jedoch so stark sein, daß diese durch Amidoschwarz nicht mehr ausreichend verdrängt werden können. Somit ergibt sich in Abhängigkeit von der Konzentration der Polyelektrolyte eine scheinbare Abnahme des Restfibrins bei der photometrischen Auswertung. Die prozentuale Verminderung des meßbaren Fibrins durch NPP und Heparin zeigt Abbildung 10.

Die verminderte Anfärbung und somit scheinbare Abnahme des Restfibrins bei Einsatz von NPP- bzw. heparinhaltigem Untersuchungsmaterial in die SFPL könnte fälschlich erhöhte Lysequoten ergeben. Dieser Fehler wurde jedoch bei unseren in vitro Untersuchungen umgangen, da in den Inkubationsboxen zur Normwertbestimmung jeweils dieselbe NPP-Konzentration vorhanden war wie in den Kammern zur Bestimmung der spontanen bzw. SK-aktivierten Lyse. Der durch NPP verursachte Fehler wirkte sich somit auf alle drei Werte gleichermaßen aus, so daß deren Relation zueinander erhalten blieb, und die Berechnung der Lysequoten korrekte Resultate ergab.

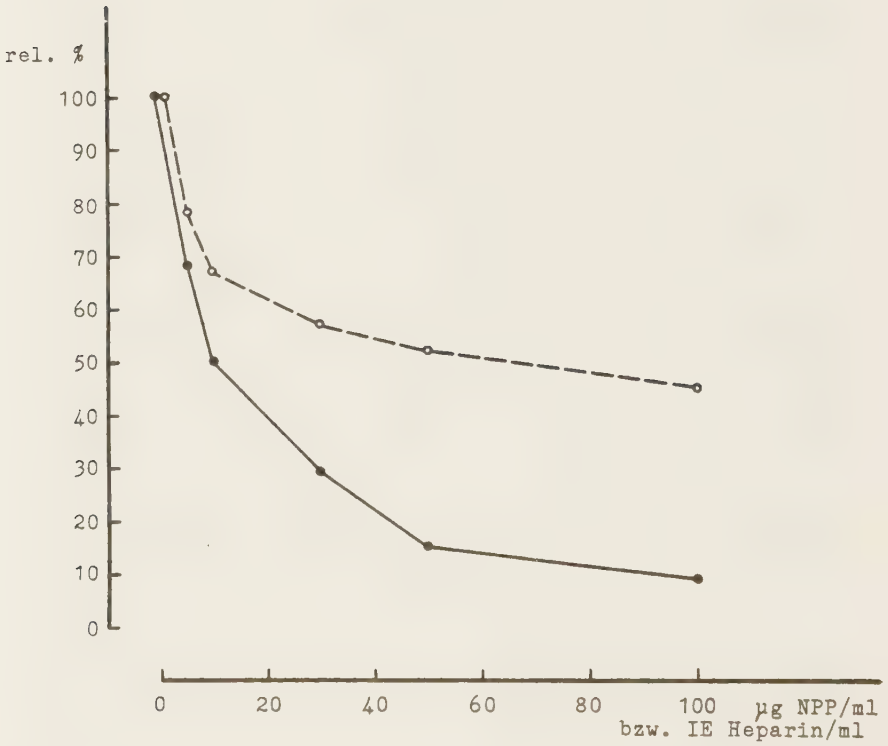


Abbildung 10: Prozentuale Abnahme der Extinktionswerte bei Zusatz von NPP und Heparin im Testansatz der SFPL

●—● NPP

○—○ Heparin

3. In vivo Untersuchungen

An sechs männlichen Probanden untersuchten wir den Einfluß von NPP auf die Fibrinolyse in vivo. Hierzu injizierten wir jedem Probanden 150 mg NPP intravenös. Diese Dosierung wird auch von anderen Untersuchern angegeben (Schneider et al., 51). Wir verwendeten das Präparat SP 54^R der Firma Benechemie, wovon 1,5 ml (=150 mg NPP) zusammen mit 18,5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung in eine 20 ml Einmalspritze aufgezogen wurden. Bei jedem Probanden erfolgten sechs Blutentnahmen: vor, direkt nach sowie 15, 45, 120 und 240 Minuten nach der Injektion. Um genügend Untersuchungsmaterial zur Verfügung zu haben, nahmen wir jeweils 30 ml Citratblut 1:10 ab. Nach dem Zentrifugieren (10 Minuten bei 3000 rpm) verblieben hiervon etwa 15 ml Citratplasma, mit dem folgende Tests durchgeführt wurden:

- Standardfibrinpapier-Lysebestimmung
- Euglobulinlysezeitbestimmung
- Fibrinplattenmethode (Plg-reich und Plg-frei)
- Glasröhrchen-Diffusionstest (Plg-reich und Plg-frei)
- Gravimetrische Fibrinogenbestimmung

Der Versuchsbeginn war jeweils zwischen 12.30 und 14.00 Uhr. Zunächst legten wir dem Probanden eine Verweilkanüle in eine Vene des Unterarms. Diese Kanüle blieb über die gesamte Versuchsdauer liegen. Nach der ersten Blutentnahme für die Ausgangswerte wurden 150 mg NPP in der oben genannten Zubereitung in einem Zeitraum von etwa 5 Minuten langsam injiziert. Vor der zweiten Blutentnahme wurden etwa 5 ml Blut abgezogen und verworfen, da diese durch den Rest der Injektionslösung in der Kanüle große Mengen an NPP enthielten. Zwischen den einzelnen Entnahmen wurde die Kanüle mit einem Stöpsel verschlossen. Das Citratblut wurde stets sofort nach der Entnahme abzentrifugiert. Jeweils 4 ml Plasma wurden für die SFPL bei -30° C eingefroren. Die Bestimmung erfolgte für jeden Probanden in einem Ansatz an einem der darauffolgenden Tage. Die übrigen Tests führten wir jeweils nach der Blut-

entnahme durch, wobei die Plasmen der ersten beiden Entnahmen wegen der kurzen Zwischenzeiten bei 4°C gelagert und mit dem Plasma der dritten Entnahme parallel verarbeitet wurden. Die Ergebnisse der in vivo Versuche mit NPP sind auf den Seiten 65 bis 69 dargestellt. Die Probanden sind mit I-VI, die jeweiligen Blutentnahmen (vor der Injektion, direkt nach der Injektion sowie nach 15, 45, 120 und 240 Minuten) mit 1-6 bezeichnet.

Tabelle 13 zeigt die Resultate der SFPL. Für jeden Probanden sind in der ersten Spalte die Extinktionswerte nach Abzug der Färbeleerwerte (E - Lw) aufgelistet, die zweite Spalte zeigt die zugehörigen Lysequoten. Zusätzlich zur Eigenlyse wurde jeweils die Lysequote nach in vitro Aktivierung im Ansatz der SFPL mit 50 IE SK bestimmt. Eine Zunahme der spontanen lytischen Aktivität nach Injektion von NPP konnte nicht festgestellt werden. Die leichten Veränderungen nach Gabe von NPP liegen im Bereich der Schwankungsbreite der Meßwerte. Eine Aktivierung der Fibrinolyse in vivo durch NPP konnten wir somit nicht nachweisen.

Die Ergebnisse der ELT-Bestimmungen zeigt Tabelle 18. Hier konnte eine deutliche Abnahme der Lysezeiten festgestellt werden. In Abbildung 11 ist dies graphisch dargestellt. Das Maximum des Effekts fand sich 45 Minuten nach der Injektion von 150 mg NPP mit einer durchschnittlichen Verminderung der ELT um 40 %. Anschließend stieg die ELT langsam wieder an. Die Ausgangswerte waren jedoch 240 Minuten nach der Injektion noch nicht wieder erreicht.

Die Resultate der FPM und des GDT mit Plg-freiem Fibrinsubstrat (Messung der Plasminaktivität) sind in den Tabellen 14 und 15 dargestellt, die Tabellen 16 und 17 beinhalten die Ergebnisse der FPM und des GDT mit Plg-reichem Substrat (Messung der Aktivatoren). Hier konnte kein Anstieg der fibrinolytischen Aktivität bzw. der Aktivatoren nach Injektion von NPP festgestellt werden.

Die Fibrinogenspiegel zeigten keine Veränderungen nach der Gabe von NPP (Tabelle 19). Bei der Durchführung der Fibrinogenbe-

Tabelle 13: In vivo Versuche mit NPP; Ergebnisse der SFPL

Proband Blut- entnahme	I		II		III		IV		V		VI		s
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	
1	481 553 339	13,0 38,7	421 504 288	16,5 43,0	467 531 318	12,0 40,1	450 430 255	18,6 40,6	430 530 320	18,9 39,6	501 557 340	10,0 38,9	14,8 40,2 1,6
2	521 615 312	15,3 49,2	425 460 430	7,6 50,0	474 524 247	9,5 52,8	362 440 222	17,7 49,5	440 515 297	14,5 42,3	476 511 297	6,8 41,9	11,9 47,6 4,5
3	511 606 309	15,7 49,0	414 440 239	16,0 45,7	494 542 299	8,9 45,0	370 450 190	17,8 57,8	437 525 325	16,8 38,1	501 537 302	6,7 43,8	12,0 46,6 6,6
4	463 541 303	14,4 44,0	401 466 290	14,0 47,8	443 500 304	11,4 39,2	365 446 184	18,1 58,7	451 556 348	18,9 37,4	406 454 285	10,5 37,2	14,6 44,1 8,3
5	490 560 313	12,5 44,1	439 504 284	13,0 43,7	463 537 297	13,8 44,7	397 485 277	18,1 42,8	443 553 322	19,9 41,7	452 499 264	9,4 47,0	14,5 44,0 1,8
6	457 529 335	13,6 36,6	447 504 274	11,3 45,7	475 504 279	5,7 44,6	375 463 285	19,0 38,4	440 537 326	18,1 39,3	477 533 283	10,5 46,9	13,0 41,9 5,0 4,3

a = Extinktionswert

EL = Eigenlyse

AL = In vitro mit 50 IE
SK aktivierte Lyse

b = Lysequote in %

NW = Normwert

Tabelle 14: In vivo Versuche mit NPP; Ergebnisse der FPM mit Plg-freiem Fibrinsubstrat ($\emptyset$ in mm)

Proband Blut-entnahme	I	II	III	IV	V	VI	$\bar{x}$	s
1	5,8	6,2	7,7	14,2	10,6	9,2	9,0	3,1
2	4,9	6,5	10,7	14,4	10,4	9,8	9,5	3,4
3	5,3	5,4	11,2	14,2	10,1	9,8	9,3	3,5
4	5,9	6,1	11,1	14,6	10,8	10,1	9,8	3,3
5	5,4	6,6	9,7	14,4	10,9	10,8	9,6	3,3
6	6,0	5,9	9,5	14,6	10,4	9,9	9,4	3,2

Tabelle 15: In vivo Versuche mit NPP; Ergebnisse des GDT mit Plg-freiem Fibrinsubstrat (Lysehöhe in mm)

Proband Blut-entnahme	I	II	III	IV	V	VI	$\bar{x}$	s
1	3,5	4,2	3,2	4,9	4,0	5,0	4,1	0,7
2	3,7	3,9	2,9	5,1	4,4	5,0	4,2	0,8
3	3,5	3,9	3,1	5,3	4,0	4,5	4,1	0,8
4	3,9	4,3	3,5	5,2	4,6	5,2	4,5	0,7
5	4,1	4,1	3,1	4,9	4,4	5,0	4,3	0,7
6	3,7	3,8	3,2	4,5	4,5	5,2	4,2	0,7

Tabelle 16: In vivo Versuche mit NPP; Ergebnisse der FPM mit Plg-reichem Fibrinsubstrat ($\emptyset$ in mm)

Proband Blut- entnahme	I	II	III	IV	V	VI	$\bar{x}$	s
1	8,7	7,8	7,3	8,9	8,7	7,9	8,2	0,6
2	7,5	7,9	6,9	9,5	9,4	7,8	8,2	1,1
3	6,8	7,2	7,8	9,6	9,1	8,2	8,1	1,1
4	7,3	8,0	8,3	9,2	9,2	7,6	8,3	0,8
5	8,6	8,1	6,9	9,4	10,1	8,8	8,7	1,1
6	8,7	7,6	7,2	9,7	8,3	8,5	8,3	0,9

Tabelle 17: In vivo Versuche mit NPP; Ergebnisse des GDT mit Plg-freiem Fibrinsubstrat (Lysehöhe in mm)

Proband Blut- entnahme	I	II	III	IV	V	VI	$\bar{x}$	s
1	3,9	4,7	4,9	2,9	4,5	5,5	4,4	0,9
2	5,1	5,1	6,5	2,9	4,3	5,3	4,9	1,2
3	5,3	4,5	5,5	2,8	4,7	5,8	4,8	1,1
4	5,5	4,9	5,6	3,0	4,2	5,6	4,8	1,0
5	5,4	5,2	5,4	3,2	4,6	5,3	4,9	0,9
6	5,4	5,0	5,1	3,0	4,5	5,6	4,8	0,9

Tabelle 18: In vivo Versuche mit NPP; Ergebnisse der ELT-Bestimmungen in Minuten

Proband Blut-entnahme	I	II	III	IV	V	VI	$\bar{x}$	s
1	330	345	330	130	360	520	335,8	124,1
2	309	345	300	130	360	520	327,3	125,3
3	185	320	215	115	190	440	244,2	116,7
4	130	205	245	80	110	320	181,6	91,5
5	135	255	250	110	260	330	223,3	83,8
6	185	300	300	125	320	405	272,5	100,7

Tabelle 19: In vivo Versuche mit NPP; Ergebnisse der Fibrinogenbestimmungen in mg/100 ml

Proband Blut-entnahme	I	II	III	IV	V	VI	$\bar{x}$	s
1	256	350	362	195	340	442	324	87
2	257	337	345	200	337	412	315	75
3	256	350	362	202	345	435	325	83
4	257	352	362	195	350	447	327	88
5	257	347	370	200	325	425	320	81
6	257	350	362	200	330	420	320	79

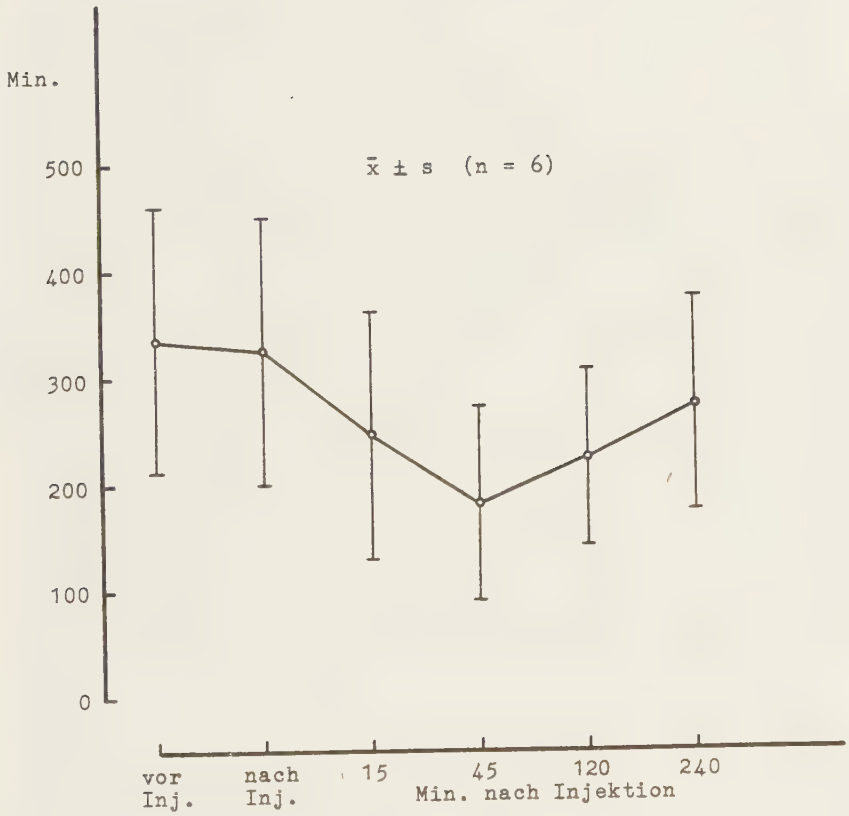


Abbildung 11: Euglobulinlysezeiten vor und nach Injektion von 150 mg NPP (i. v.)

stimmungen fiel uns jedoch auf, daß es bei den Plasmen der zweiten und dritten Blutentnahme zu einer deutlichen Gerinnungshemmung gekommen war. Während die Gerinnung normalerweise 1 bis 2 Minuten nach Zugabe der CaCl_2 -Lösung einsetzte, trat sie hier erst nach etwa 8 bis 10 Minuten ein. Das entstandene Gerinnsel war außerdem nicht homogen trüb, sondern flockig. Es ließ sich jedoch vollständig um den Glasstab wickeln, was in den im Vergleich zu den Ausgangswerten unveränderten Fibrinogenspiegeln zum Ausdruck kommt. Um diesen gerinnungshemmenden Effekt zu dokumentieren, führten wir bei den Probanden IV, V und VI mit den Plasmen der ersten drei Blutentnahmen zusätzlich die Thrombelastographie nach HARTERT (24) durch. Die gemessenen Reaktionszeiten zeigt Tabelle 20. Bei dem Probanden IV zeigte das direkt nach der Injektion entnommene Plasma eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 47 Minuten. Die Plasmen der Probanden V und VI ließen direkt nach der Injektion im Thrombelastogramm keine Gerinnung mehr erkennen. Der gerinnungshemmende Effekt des NPP nahm bereits 15 Minuten nach der Injektion wieder ab. Bei der Durchführung der Fibrinogenbestimmungen mit den 45 Minuten nach der Injektion entnommenen Plasmen konnte makroskopisch keine Gerinnungshemmung mehr festgestellt werden.

Tabelle 20:

Proband Blut- entnahme	IV	V	VI
1	3 Min. 45 Sek.	5 Min. 00 Sek.	5 Min. 45 Sek.
2	47 Min. 00 Sek.	ungerinnbar	ungerinnbar
3	10 Min. 45 Sek.	21 Min. 30 Sek.	25 Min. 00 Sek.

VII. DISKUSSION

A. Methodenvergleich

1. Lysezeitbestimmungen

Die Vollblutlysezeitbestimmung ist ein einfacher Globaltest zur Erfassung der Fibrinolyse. Sie ist bei geringem Materialaufwand technisch leicht durchführbar und dürfte die Verhältnisse in vivo wohl am ehesten widerspiegeln. Aufgrund der stark wirksamen Inhibitoren ist die Lysezeit des Vollblutgerinnsels unter normalen Bedingungen größer als 24 Stunden. Meist konnten wir selbst nach 48 Stunden keine vollständige Lyse beobachten, was wohl auf den Aktivitätsverlust der fibrinolytischen Enzyme während der langen Inkubationszeit zurückzuführen ist. Eine Bestimmung des Lyseendpunktes ist somit unter normalen Bedingungen nicht möglich. Lysezeiten unter 24 Stunden weisen auf eine gesteigerte fibrinolytische Aktivität hin. Das Ergebnis ist allerdings qualitativ und erlaubt nur eine grobe Abschätzung. Ein wesentlicher Nachteil der Methode ist ihre Unempfindlichkeit, da verkürzte Lysezeiten nur bei beträchtlicher Hyperfibrinolyse zustande kommen. Geringgradig gesteigerte fibrinolytische Aktivitäten werden nicht erfaßt (v. Kaulla und Schultz, 33). Aus der zum Ausschluß einer verstärkten Fibrinolyse notwendigen langen Beobachtungszeit von 24 Stunden ergibt sich ferner ein schwieriges Personalproblem, so daß das Verfahren kaum in den Betrieb eines Routinelabors integriert werden kann.

Demgegenüber bietet die Bestimmung der ELT wesentliche Vorteile. Durch die Ausschaltung der Inhibitoren werden erheblich kürzere Lysezeiten erreicht. Diese sind unter normalen Bedingungen größer als drei Stunden und betragen bei unseren Untersuchungen bis zu über 8 Stunden. Nach CONRAD (11) sind jedoch auch Werte bis zu 20 Stunden möglich. Das Verfahren ist technisch ebenfalls leicht durchführbar. Da eine gesteigerte fi-

brinolytische Aktivität bereits nach 3 Stunden ausgeschlossen werden kann, ist eine Eingliederung in den Routinebetrieb eines Labors besser möglich als bei der Vollblutlysezeitbestimmung. Die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse ist befriedigend (VK = 5,8 %). Bei der Bestimmung der ELT werden in erster Linie die Aktivatoren der Fibrinolyse erfaßt (Graeff und Beller, 17). Auch bei unseren Untersuchungen an Probanden zeigten die ELT's eine bessere Korrelation mit den Aktivatormessungen auf Plg-reichem Fibrinsubstrat als mit den Plasminmessungen auf Plg-freiem Fibrinsubstrat. Dies ist verständlich, da das aus der Euglobulinlösung entstandene Gerinnsel durch die selektive Adsorption von Plg an Fibrin während des Gerinnungsvorganges ebenfalls Plg-reich ist.

Zur ELT muß jedoch kritisch bemerkt werden, daß die Verdünnung und Ansäuerung des Plasmas bei der Euglobulinfällung eine Milieuveränderung darstellt, die höchstwahrscheinlich die physiologischen Funktionen der Proteine beeinflusst (v. de Loo, 39). Außerdem ist die nachfolgende Entfernung der Inhibitoren ein grober Eingriff in das komplexe Fibrinolyse-System. Somit handelt es sich um ein artifizielles Testsystem, das die physiologischen Verhältnisse nur bedingt widerspiegelt.

Ein weiterer Nachteil aller Lysezeitbestimmungen ist deren relative Unspezifität. Einerseits wird durch die Erfassung der Fibrinolyse anhand des endogenen Fibringerinnsels eine gewisse Annäherung an die Verhältnisse in vivo erreicht, andererseits besteht aber dadurch auch eine Abhängigkeit des Testergebnisses vom fibrinbildenden Potential. So führen ein Mangel an Gerinnungsfaktoren, Antikoagulantien vom Typ der Heparine, gerinnungshemmende FSP wie auch die Dysfibrinogenämie mit veränderter Gerinnselstruktur zu verkürzten Lysezeiten ohne Hyperfibrinolyse. Wie unsere Untersuchungen mit den Lysezeitbestimmungen zeigten, kommt es ab einem gewissen Grad der Fibrinolyseaktivierung zu einer Ungerinnbarkeit der Testlösung. Hierbei wirken mehrere Faktoren zusammen. Zum einen kann entstehendes Fibrin so schnell lysiert werden, daß eine sichtbare

Gerinnungsbildung nicht zustande kommt. Andererseits entstehen bei der Lyse gerinnungshemmende FSP. Ferner muß auch berücksichtigt werden, daß durch eine gleichzeitige Fibrinogenolyse die Fibrinogenspiegel ebenso wie die Spiegel anderer Gerinnungsfaktoren absinken. Die beiden letztgenannten Faktoren können eine Ungerinnbarkeit bedingen, ohne daß weiterhin eine gesteigerte Fibrinolyse besteht. Eine genaue Beurteilung des fibrinolytischen Status ist unter diesen Bedingungen nur anhand von Testmethoden mit standardisiertem Fibrinsubstrat möglich. Doch auch bei gesteigerter Fibrinolyse können die Lysezeiten im Normbereich liegen. Wenn die Plg-Spiegel auf nahezu null abgefallen sind, wie es bei extremer Hyperfibrinolyse zu beobachten ist, kann eine Lyse des Gerinnsels in vitro nicht mehr stattfinden (Graeff und Beller, 17). Der Nachweis von Fibrinolyseaktivatoren ist unter diesen Umständen nur mit exogenem Plg-reichem Fibrinsubstrat möglich. Aufgrund der genannten Nachteile kann die Vollblutlysezeitbestimmung zur Beurteilung der Fibrinolyse nicht empfohlen werden. Die Bestimmung der ELT hingegen ist ein praktikables Verfahren, das auch für den Routinebetrieb bei klinischen Fragestellungen geeignet ist. Die Aussagekraft des Tests ist jedoch begrenzt, und die Resultate bedürfen einer kritischen Interpretation.

2. Nachweis von Fibrinogen-Fibrin-Spaltprodukten mit dem Staphylokokken-Clumping-Test

Der SCT ist ein einfaches, weitgehend standardisiertes und hoch empfindliches Verfahren zum Nachweis von FSP. Die Meßwerte stehen bereits nach etwa einer Stunde zur Verfügung. Die Verklumpungsreaktion ist jedoch nicht absolut spezifisch. Neben den frühen FSP X und Y reagieren auch Fibrinogen, Fibrinmonomere und lösliche, ungerinnbare Komplexe aus FSP und Fibrinmonomeren (Allington, 2; Lipinski et al., 37). Zur selektiven Erfassung der FSP muß der Test daher stets im Serum durchgeführt werden, doch auch hierbei ergeben sich mehrere Probleme. Etwa 50 % der hochmolekularen FSP X und Y und etwa

10 % der niedermolekularen FSP D und E werden im Gerinnsel eingeschlossen und somit dem Nachweis im Serum entzogen (Ni-lehn, 47). Bei defekter Gerinnselstruktur hingegen können Fibrin und Restfibrinogen ins Serum übertreten und zu fälschlich erhöhten Werten führen (Wenzel et al., 64). Auch hohe Antikörpertiter gegen Staphylokokken im Serum bei Staphylokokkeninfekten können im SCT eine Agglutination hervorrufen und FSP vortäuschen. Eine Unterscheidung zwischen Agglutination und Klumpungsreaktion ist möglich, wenn das Serum auf 60° C erhitzt wird. Hierbei geht die Klumpungsaktivität des Serums verloren, wohingegen die Fähigkeit der Antikörper zur Agglutination der Staphylokokken erhalten bleibt (Hawiger et al., 25). Während der Lyse eines gereinigten Fibringerinnsels durch Plasmin in vitro nimmt die Klumpungsaktivität des Überstandes mit zunehmender Lysedauer rasch ab. Der Grund hierfür ist, daß die in späten Fibrinolysestadien entstehenden niedermolekularen FSP nicht mit dem Clumpingfaktor reagieren (Hawiger et al., 25). Auch in vivo werden bei ausgeprägter Hyperfibrinolyse die FSP X und Y rasch zu den niedermolekularen FSP D und E abgebaut. LIPINSKI et al. (38) jedoch schlossen aus ihren Untersuchungen, daß die späten FSP D und E indirekt mit dem SCT gemessen werden, indem sie mit Fibrinmonomeren lösliche Komplexe bilden, die zur Klumpung führen. Dies setzt die Anwesenheit von Fibrinmonomeren voraus.

Die genannten Faktoren schränken die Aussagekraft des SCT bei der Beurteilung der Fibrinolyse ein. Da nur die Endprodukte der Lysereaktion gemessen werden, kann aus dem Testergebnis nicht ohne weiteres entnommen werden, ob weiterhin eine gesteigerte fibrinolytische Aktivität besteht, oder ob der Prozeß bereits beendet ist. Wie unsere Untersuchungen ferner ergaben, kann aus den Ergebnissen des SCT nicht auf den Grad der Fibrinolyseaktivierung geschlossen werden, da die Konzentration der nachgewiesenen FSP nicht mit den Resultaten anderer Fibrinolyse-tests korrelierte. Auch LIPINSKI et al. (38) fanden keine Korrelation zwischen FSP und systemischer Fibrinolyseaktivität. Sie kamen hierdurch zu dem Schluß, daß die FSP vor allem Aus-

druck lokaler Fibrinolysevorgänge bei verschiedenen Krankheiten sind. Bei einem der von uns untersuchten Patienten konnten trotz gesteigerter lytischer Aktivität und erfolgreicher Lyse-therapie keine FSP nachgewiesen werden. Als alleinige Informationsquelle zur Beurteilung des fibrinolytischen Status erscheint der SCT daher nicht geeignet.

3. Lysebestimmung mit standardisiertem Fibrinsubstrat

Die Lysetests mit standardisiertem Fibrinsubstrat sind aufwendige quantitative Meßmethoden. Sie erlauben eine spezifische Beurteilung der Fibrinolyse unabhängig vom fibrinbildenden Potential und besitzen somit große Vorteile gegenüber den Lysezeitbestimmungen. Bei unseren vergleichenden Untersuchungen erwies sich die SFPL der FPM und dem GDT in zahlreichen Punkten als überlegen. Wichtige Kriterien zur Beurteilung des Wertes von Labormethoden sind die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit, ausgedrückt durch die VK's innerhalb eines Testansatzes und von Tag zu Tag. Nach BÜRGI (7) sollte bei enzymatischen Bestimmungen ein VK von 10 % nicht überschritten werden. Diese Forderung wird von der SFPL voll erfüllt. Der VK innerhalb eines Testansatzes beträgt 3,6 %, derjenige von Tag zu Tag 5,0 %. Die FPM und der GDT lieferten deutlich schlechtere Werte, die zum Teil über der geforderten Normgrenze liegen (siehe Seite 46). Der Hauptgrund für die Überlegenheit der SFPL ist nach unserer Meinung in der Art des standardisierten Fibrinsubstrates zu suchen, zu dessen Herstellung bei allen drei Methoden das Fibrinogenpräparat der Behringwerke AG verwendet wurde. Sowohl Fibrinplatten als auch Fibrinröhrchen müssen an jedem Versuchstag frisch hergestellt werden. Hierbei ergeben sich zahlreiche Fehlermöglichkeiten wie z. B. Wägefehler beim Abwiegen des Fibrinogens, Verdünnungsfehler, Pi-pettierfehler, Temperaturschwankungen oder Verunreinigungen der Puffer. Das SFP hingegen ist ein industriell in größeren Mengen gefertigtes und exakt standardisiertes Fibrinsubstrat, das über längere Zeit aufbewahrt werden kann und somit jederzeit rasch zur Verfügung steht. Aber auch die Testdurchführung

ist bei der SFPL wesentlich einfacher als bei den anderen Methoden. So bereitet es bei der FPM Schwierigkeiten, die Testlösung exakt auf der Fibrinplatte zu plazieren, da stets die Gefahr besteht, daß der Tropfen auf der Oberfläche der Fibrinschicht auseinanderläuft, was zu Unregelmäßigkeiten der Lysezone führt. Beim Einpipettieren der Testlösung in die Fibrinröhrchen des GDT beobachteten wir häufig, daß zwischen der Oberfläche der Fibrinsäule und der Lösung Luftblasen eingeschlossen werden, was sicherlich die Diffusion der fibrinolytischen Enzyme ins Fibrin behindert. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß bei beiden Verfahren sehr kleine Probenvolumina eingesetzt werden, was mit einem relativ großen Pipettierfehler verbunden ist. Demgegenüber ist das Beschicken der Inkubationsboxen der SFPL wesentlich einfacher und kann auch von ungeübten Kräften leicht durchgeführt werden. Die Bestimmung des Lyseendergebnisses ist bei der SFPL nur nach einem komplizierten Färbe-, Entfärbe- und Eluationsvorgang möglich. Dieser Schritt konnte durch eine Automatisierung weitgehend vereinfacht und standardisiert werden, der apparative Aufwand ist jedoch vergleichsweise hoch. Eine Kontrolle ist durch die stets mitbestimmten Färbeleerwerte möglich (Thym, 58). Ihr VK betrug 4,2 %, was die Zuverlässigkeit des benutzten Gerätes unterstreicht. Bei der anschließenden photometrischen Auswertung können die Resultate mit einer hohen Genauigkeit abgelesen werden. Im Vergleich hierzu ist die Ausmessung der Lysezonendurchmesser bzw. Lysehöhen mit einer Milimeterskala relativ ungenau. Ferner ergeben sich bei der FPM hierbei Probleme, wenn die Lysezonen unregelmäßig geformt sind. Auch beim GDT beobachteten wir öfter stärkere Unregelmäßigkeiten an der Grenze zwischen lysiertem und nicht lysiertem Anteil der Fibrinsäule. Derartige Ergebnisse sind nicht verwertbar. Es empfiehlt sich daher, mit der FPM und dem GDT stets Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchzuführen. Bei der hohen Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der SFPL hingegen sind Einfachbestimmungen in einem gut eingearbeiteten Labor gerechtfertigt.

In Bezug auf die Empfindlichkeit erwies sich die SFPL der FPM und dem GDT ebenfalls als überlegen. Bei Einsatz von Plasma er-

reichten wir weder mit der FPM noch mit dem GDT eine Lyse des Fibrins, so daß Euglobuline als Testmaterial verwendet werden müssen. Auch bei der Erfassung interindividueller Unterschiede der spontanen fibrinolytischen Aktivität waren diese beiden Methoden unempfindlicher als die SFPL. Die FPM schnitt hier am schlechtesten ab. Dies ist dadurch zu erklären, daß bei der FPM nur eine geringe Kontaktfläche zwischen Testlösung und Fibrinsubstrat besteht. Außerdem laufen beim Eindringen der Testlösung ins Fibrin während der initialen Phase der Lyse komplizierte dreidimensionale Diffusionsvorgänge ab, bei denen die fibrinolytischen Enzyme proportional zum Quadrat des Abstandes vom Auftragspunkt verdünnt werden (Yasukouchi und Watanabe, 70). Beim GDT ist dieses Problem reduziert auf eine eindimensionale Diffusion. Das SFP hingegen taucht mit seiner großen Oberfläche vollständig in die Testlösung ein, wodurch der Angriff des Plasmins erleichtert und die Empfindlichkeit des Tests gesteigert werden.

Bei Einsatz einer SK-Aktivierungsreihe zeigten alle drei Lysebestimmungsmethoden mit standardisiertem Fibrinsubstrat ein prinzipiell gleiches Verhalten. Auch die Untersuchungen an Probanden und Patienten ergaben eine sehr gute Übereinstimmung der Meßwerte von SFPL, FPM und GDT. Die mit diesen Verfahren gewonnenen Ergebnisse sind somit durchaus vergleichbar.

Da bei der FPM und dem GDT Euglobuline eingesetzt werden müssen, handelt es sich aus den im Abschnitt VII. A. 1. genannten Gründen um artifizielle Testsysteme. Bei der SFPL jedoch kann Plasma direkt eingesetzt werden, was den Verhältnissen in vivo sicherlich näher kommt. Es muß dabei aber kritisch bemerkt werden, daß durch die starke Verdünnung des Plasmas in den Inkubationsboxen ebenfalls ein künstliches Milieu geschaffen wird. Dies entspricht dem Vorgehen bei der "Diluted Blood Clot Lysis Time" nach FEARNEY (13), bei der man durch die Verdünnung eine Wirkungsabschwächung der Fibrinolyseinhibitoren erreicht. Zudem erfolgt die Lysemessung bei allen drei Verfahren anhand von teilweise denaturiertem Fibrin, das sich in Konsis-

tenz und Ultrastruktur von dem physiologischen Substrat unterscheidet. Somit werden die Verhältnisse in vivo nur bedingt widergespiegelt. Ein weiterer Nachteil der Lysetests mit standardisiertem Fibrinsubstrat ist ihr großer Material- und Zeitaufwand, der einer breiten Anwendung im Routinebetrieb entgegensteht. Da die Meßwerte frühestens am Tag nach der Blutentnahme zur Verfügung stehen, sind diese Verfahren bei klinischen Fragestellungen, die ein rasches Handeln erfordern, wenig geeignet. Ihr hauptsächlicher Einsatz erfolgt bei wissenschaftlichen Untersuchungen, wo sie gegenüber den einfachen Lysezeitbestimmungen zahlreiche Vorteile besitzen. Aufgrund der Überlegenheit der SFPL in Bezug auf Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit gegenüber der FPM und dem GDT geben wir diesem Verfahren den Vorzug.

4. Lysemessung nach Streptokinase-Aktivierung

Wie unsere Untersuchungen zeigten, müssen bei der Messung der fibrinolytischen Aktivität nach Aktivierung mit SK einige Besonderheiten beachtet werden, die sich aus dem komplizierten Aktivierungsmechanismus ergeben. Der Eingriff von SK in das Fibrinolyse-System erfolgt in zwei Stufen. Im ersten Schritt verbinden sich SK und Plg zu einem Komplex, der den eigentlichen Aktivator darstellt. Dieser wandelt in einem zweiten Schritt Plg zu Plasmin um (Martin, 41, 42). Der gesamte Aktivierungsvorgang läuft nach einer dem Massenwirkungsgesetz ähnlichen Kinetik ab. Bei Zusatz von SK in abgestuften Konzentrationen zu Plasma und anschließender Testung der Aktivierungsansätze auf Plg-reichem und Plg-freiem Fibrinsubstrat zeigte sich, daß Aktivator und Plasmin jeweils in bestimmten Relationen gebildet werden. Bei niedrigen SK-Konzentrationen entsteht vorwiegend Plasmin. Nach SCHWICK und HEIMBURGER (53) liegt das Maximum der Plasminbildung bei einem Molverhältnis von Plg zu SK wie 10:1. Bei höheren SK-Konzentrationen fällt die freie Plasminaktivität ab zugunsten einer vermehrten Bildung von Aktivatoren. Verwendet man zur Fibrinolysemessung nur

Plg-freies Fibrinsubstrat wie z. B. bei der SFPL, wodurch nur Plasmin gemessen wird, so kann nicht entschieden werden, ob die Meßwerte in den Bereichen vor oder hinter dem Maximum der Plasminbildung liegen, was sicherlich für die Beurteilung der Fibrinolyse wichtig wäre. Auch der von GOOSSENS (14) beschriebene Lysehemmeffekt bei hohen SK-Konzentrationen läßt sich somit erklären, da die Bestimmung nur auf Plg-freiem Fibrin erfolgte. Zur genauen Erfassung des fibrinolytischen Status nach SK-Aktivierung sollte daher stets im Zweiphasensystem auf Plg-freiem und Plg-reichem Fibrinsubstrat gemessen werden. Dies ist bisher nur mit der FPM und dem GDT möglich, da das SFP lediglich in einer Plg-freien Form verfügbar ist. Daraus ergibt sich für zukünftige Untersucher die Aufgabe, Plg-reiche SFP's herzustellen. Auch zur Klärung der Frage, welche Größe - Plasminaktivität oder Aktivatoraktivität - für eine Fibrinolyse bzw. Thrombolyse in vivo entscheidend ist, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

B. Beeinflussung der Fibrinolyse durch Natrium-Pentosanpoly-sulfat

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, haben bisher zahlreiche Autoren eine Aktivierung der Fibrinolyse durch NPP sowohl in vivo als auch in vitro beschrieben. Unsere Untersuchungen mit der SFPL enttäuschten jedoch. In vitro konnte nach Zusatz des NPP in Konzentrationen von 10 bis 100 µg/ml im Testansatz keine Steigerung der fibrinolytischen Aktivität von reiner Plg-Lösung bzw. Plasma nachgewiesen werden. Die Aktivierung mit 50 IE SK wurde unter diesen Bedingungen ebenfalls nicht beeinflusst. In vivo konnten wir in einem Zeitraum von 4 Stunden nach intravenöser Injektion von 150 mg NPP mit der SFPL keinen Effekt auf die Fibrinolyse beobachten. HALSE (18, 19, 20) untersuchte den Einfluß von NPP auf die Fibrinolyse, indem er frische Plas-magerinnsel inkubierte und in bestimmten Zeitabständen deren Proteingehalt ermittelte. Bei diesem Vorgehen wird die fibri-

nolytische Aktivität unter weitgehender Annäherung an die physiologischen Verhältnisse quantitativ gemessen. Die Applikation von NPP ergab sowohl in vitro als auch in vivo eine gesteigerte Lyse, wobei ein Einfluß der antikoagulatorischen Wirkung ausgeschlossen werden konnte. Dies steht in Widerspruch zu unseren Ergebnissen mit der SFPL. HALSE weist in seinen Arbeiten darauf hin, daß der Nachweis einer fibrinolyseaktivierenden Wirkung von NPP in artifiziellen Systemen mit gereinigten, partiell denaturierten Fibrinsubstraten nicht möglich sei. Er begründet dies mit dem Fehlen wesentlicher Komponenten des physiologischen Fibrinolysesystems und mit Strukturabweichungen getrockneter Fibrinogenpräparate im Vergleich zu Nativgerinnseln. Diese Einwände sind sicherlich gerechtfertigt, was die Testung von Euglobulinen auf Fibrinplatten bzw. Fibrinröhrchen betrifft. Da bei der SFPL jedoch Plasma eingesetzt wird, kann nicht von einem inkompletten System gesprochen werden. Andererseits ist es nur schwer verständlich, wieso sich eine durch NPP aktivierte Fibrinolyse nicht an gereinigten Fibrinsubstraten wie dem SFP demonstrieren lassen soll, da ja der Nachweis einer Plasminaktivität anhand von diesem Substrat mit einer hohen Empfindlichkeit möglich ist.

Die gemessenen Fibrinogenspiegel zeigten nach der Injektion von NPP keine Veränderung, bei deren Bestimmung machte sich jedoch eine gerinnungshemmende Wirkung des NPP bemerkbar. Diese verifizierten wir mit Hilfe der Thrombelastographie. Der antikoagulatorische Effekt war direkt nach der Injektion am ausgeprägtesten und nahm bereits 15 Minuten später wieder ab. Dies stimmt mit den Ergebnissen von SCHNEIDER et al. (51) überein, die unter ähnlichen Bedingungen direkt nach der Injektion eine kurzfristige Verlängerung der Rekalzifizierungszeit beschrieben. Die gerinnungshemmende Wirkung des NPP kommt durch eine Potenzierung der Faktor Xa-Inhibierung zustande, der Antithrombineffekt hingegen ist nur gering ausgeprägt (Vinazzer et al., 61; Merckl et al., 44).

Die ELT's nahmen nach der Injektion von NPP deutlich ab. Das

Maximum der Wirkung fanden wir 45 Minuten p. i. mit einer Verkürzung der ELT's um durchschnittlich 40 % des Ausgangswertes. Ein zeitlicher Zusammenhang zwischen diesem Effekt und der initialen Hypokoagulabilität konnte nicht festgestellt werden, so daß eine Gerinnungshemmung als Ursache der verkürzten ELT's nicht anzunehmen ist. Auch COCCHERI et al. (9) fanden keine Parallelität zwischen ELT-Verkürzung und Faktor Xa-Inhibierung. MARTIN (43) konnte auch nach Zusatz von NPP zum Plasma in vitro vor der Euglobulinfällung verkürzte ELT's nachweisen. Er stellte jedoch fest, daß nach Zugabe von NPP in Abhängigkeit von dessen Konzentration Gewicht, Volumen und Plg-Gehalt des Euglobulinpräzipitates zunehmen. Die ELT-Verkürzung konnte so durch eine vermehrte Ausfällung von Plg erklärt werden. Nach MARTIN ist die ELT aufgrund dieses methodischen Problems kein geeigneter Parameter zum Nachweis einer Aktivierung der Fibrinolyse durch NPP in vitro oder in vivo. Da der Einfluß von NPP auf die Plg-Fällung konzentrationsabhängig ist, wäre das Maximum der ELT-Verkürzung bei intravenöser Gabe von NPP zum Zeitpunkt der höchsten Plasmakonzentration, also direkt nach der Injektion, zu erwarten. Bei unseren Versuchen fanden wir den maximalen Effekt jedoch erst 45 Minuten nach der Injektion, so daß dieser nicht allein durch eine methodisch bedingte vermehrte Plg-Ausfällung erklärt werden kann. Aus unseren Ergebnissen muß daher auf eine Aktivierung der Fibrinolyse durch NPP geschlossen werden. Bei Testung der Euglobulinlösungen auf Fibrinplatten und Fibrinröhrchen konnte weder mit Plg-reichem noch mit Plg-freiem Fibrinsubstrat eine gesteigerte Lyse nachgewiesen werden. Wahrscheinlich sind diese beiden Methoden zu unempfindlich, um die relativ geringe Lysesteigerung nach Gabe von NPP anzuzeigen.

MARKWARDT und KLÖCKING (40) konnten mit ihren Untersuchungen am Modell des perfundierten Schweineohrs nachweisen, daß NPP unter diesen Bedingungen eine Freisetzung von Fibrinolyseaktivatoren aus dem Gewebe induziert. Dieser Wirkungsmechanismus erklärt die von uns festgestellten Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der SFPL und der ELT. Eine Aktivierung der

Fibrinolyse durch NPP in vitro kann dabei nicht stattfinden, was an den negativen Ergebnissen unserer in vitro Versuche mit der SFPL zum Ausdruck kommt. Unklar bleibt jedoch die von HALSE beobachtete Wirkung in vitro. Was unsere in vivo Versuche betrifft, so ist es wahrscheinlich, daß durch NPP freigesetzte Aktivatoren durch Inhibitoren neutralisiert wurden und somit nicht zu einer mit der SFPL nachweisbaren Steigerung der Plasminaktivität im Plasma führten. Erst nach Ausschaltung der Inhibitoren durch die Euglobulinfällung wurden die Aktivatoren wirksam und führten zu einer Verkürzung der ELT. Zur weiteren Klärung der Wirkung von NPP auf die Fibrinolyse und zur Überprüfung unserer Annahmen sollte in Zukunft versucht werden, Plg-reiche SFP's herzustellen, um damit Fibrinolyseaktivatoren mit einer hohen Empfindlichkeit messen zu können.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden folgende Nachweismethoden der Fibrinolyse hinsichtlich Genauigkeit, Reproduzierbarkeit, Empfindlichkeit, Aussagekraft und Laborfreundlichkeit miteinander verglichen:

- a. Vollblutlysezeitbestimmung (VLZ)
- b. Euglobulinlysezeitbestimmung (ELT)
- c. Staphylokokken-Clumping-Test (SCT)
- d. Fibrinplattenmethode (FPM)
- e. Glasröhrchen-Diffusionstest (GDT)
- f. Standardfibrinpapier-Lysebestimmung (SFPL)

Hierzu bestimmten wir die Variationskoeffizienten (VK) der Verfahren b, d, e und f als Maß für die methodisch bedingte Streubreite der Meßwerte. Weiterhin wurden diese Tests anhand einer Streptokinase-Aktivierungsreihe miteinander verglichen. An 10 klinisch gesunden Probanden sowie an 10 Patienten, die wegen einer arteriellen Verschlußkrankheit mit der Katheterlyse nach HESS behandelt wurden, untersuchten wir die Fibrinolyse simultan mit allen genannten Methoden. Durch unsere Untersuchungen kamen wir zu folgenden Aussagen:

1. Die VLZ ist ein einfacher Globaltest zur Fibrinolysemessung. Wegen ihrer Unempfindlichkeit, dem großen Zeitaufwand zur Beobachtung des Lysevorganges sowie der durch die Abhängigkeit vom Gerinnungspotential bedingten Unspezifität kann dieses Verfahren nicht empfohlen werden. Demgegenüber bietet die ELT den Vorteil einer wesentlich größeren Empfindlichkeit. Nach dem SCT liefert die ELT mit einer Testdauer von maximal drei Stunden zum Ausschluß einer Hyperfibrinolyse die schnellsten Ergebnisse und ist somit bei dringlichen klinischen Fragestellungen das geeignetste Verfahren. Die Zuverlässigkeit ist mit einem VK von 5,8 % befriedigend. Gemessen werden vorwiegend Fibrinolyseaktivatoren. Nachteile sind die Abhängigkeit vom Gerinnungspotential sowie das durch Ansäuerung und Verdünnung des Plasmas bedingte artifizielle Testmilieu, das die

Verhältnisse in vivo nur bedingt widerspiegelt. Bei allen Lysezeitbestimmungen tritt ab einem gewissen Grad der Lyseaktivierung eine Ungerinnbarkeit ein. Quantitative Aussagen über die aktuelle fibrinolytische Aktivität sind unter diesen Bedingungen nur anhand von Tests mit standardisiertem exogenem Fibrinsubstrat möglich.

2. Der SCT ist ein einfach durchführbarer, weitgehend standardisierter und hochempfindlicher Schnelltest zum quantitativen Nachweis von Fibrinospaltprodukten. Ein Nachteil der Methode ist darin zu sehen, daß das Substrat der Klumpungsreaktion unter normalen Testbedingungen nicht eindeutig definiert ist, was zu Fehlinterpretationen führen kann. Die Höhe der FSP-Spiegel korrelierte nicht mit den in anderen Tests gemessenen fibrinolytischen Aktivitäten. Da der SCT nur die Endprodukte abgelaufener Reaktionen mißt, kann keine Aussage über die aktuelle Lyseaktivität gemacht werden. Der SCT ist daher als alleiniger Test zur Beurteilung der Fibrinolyse ungeeignet.

3. Die SFPL, die FPM und der GDT sind aufwendige quantitative Methoden zur Messung fibrinolytischer Enzymaktivitäten. Sie haben eine wesentlich größere Spezifität und Aussagekraft als die Lysezeitbestimmungen. Die VK's der FPM innerhalb eines Testansatzes betragen 7,4 % bzw. 6,2 %, von Tag zu Tag 10,2 % bzw. 12,0 % (jeweils Plg-reiches bzw. Plg-freies Fibrinsubstrat). Für den GDT ergaben sich innerhalb eines Testansatzes VK's von 10,0 % bzw. 8,0 %, von Tag zu Tag von 11,0 % bzw. 14,0 %. Die methodisch bedingte Streubreite dieser Methoden ist also relativ groß. Auch sind diese Tests relativ unempfindlich, da eine Lysemessung nur mit den artifiziellen Euglobulinen, nicht jedoch mit Plasma möglich ist. Die SFPL erwies sich sowohl in Bezug auf die Empfindlichkeit als auch auf die methodisch bedingte Fehlerbreite (VK = 3,6 % innerhalb eines Testansatzes, 5,0 % von Tag zu Tag) als überlegen und ist somit als das beste Verfahren zur Lysemessung anzusehen. Da Plasma direkt eingesetzt werden kann, wird eine gute Annäherung an die Verhältnisse in vivo erreicht.

Die Überlegenheit der SFPL im Vergleich mit der FPM und dem GDT beruht nach unserer Ansicht vor allem auf dem wesentlich exakter standardisierten Fibrinsubstrat. Der bei der SFPL zur Auswertung notwendige komplizierte Färbevorgang läuft teilweise automatisiert ab. Der VK dieses Vorgangs betrug bei unseren Untersuchungen 4,2 %, was die Zuverlässigkeit des benutzten Gerätes unterstreicht. Ein Nachteil der SFPL besteht darin, daß das Standardfibrinpapier (SFP) bisher nur in einer Plg-freien Form zur Plasminmessung zur Verfügung steht. Zur exakten Beurteilung des fibrinolytischen Status, vor allem nach Streptokinase-Aktivierung, sollten nach unseren Ergebnissen stets Plasminaktivität und Aktivatoraktivität bestimmt werden. Es sollte daher in Zukunft versucht werden, auch Plg-reiche SFP's herzustellen. Die mit der SFPL, der FPM und dem GDT gemessenen Werte korrelierten gut miteinander. Bei Einsatz einer Streptokinase-Aktivierungsreihe zeigten alle drei Methoden ein analoges Verhalten. Die mit diesen Verfahren gewonnenen Ergebnisse sind somit durchaus vergleichbar. Nachteilig sind der große Material- und Zeitaufwand der Lysetests mit standardisiertem Fibrinsubstrat. Die Anwendbarkeit im Routinebetrieb bei klinischen Fragestellungen wird dadurch eingeschränkt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit untersuchten wir den Einfluß von Natrium-Pentosanpolysulfat auf die Fibrinolyse erstmals mit Hilfe der SFPL. NPP ist ein semisynthetisch hergestellter Polysaccharidschwefelsäureester, der die Fibrinolyse sowohl in vitro als auch in vivo aktivieren soll. Die bisherigen Untersuchungen zahlreicher Autoren hatten jedoch teilweise widersprüchliche Resultate ergeben. Bei unseren Experimenten in vitro zeigte NPP in Konzentrationen von 10 bis 100 µg/ml im Testansatz der SFPL keine Wirkung auf die lytische Aktivität von Plasma und reiner Plg-Lösung. NPP selbst hat somit keine Aktivatoreigenschaften. Die Aktivierung mit Streptokinase wurde durch NPP ebenfalls nicht beeinflusst. NPP und Heparin erwiesen sich als Störfaktoren bei der Anfärbung des Restfibrins

mit Amidoschwarz. Ein dadurch bedingtes fehlerhaftes Ergebnis der SFPL konnte jedoch bei dem von uns gewählten Testansatz ausgeschlossen werden. Die Wirkung von NPP auf die Fibrinolyse in vivo untersuchten wir an sechs Probanden, denen wir jeweils 150 mg NPP intravenös verabreichten. Mit der SFPL konnten wir in einem Zeitraum von vier Stunden p. i. keine Zunahme der Plasminaktivität feststellen. Die Fibrinogenspiegel blieben ebenfalls konstant, eine Fibrinogenolyse fand nicht statt. Im Thrombelastogramm beobachteten wir eine initiale Gerinnungshemmung nach der Injektion, die bereits 15 Minuten später wieder rückläufig war. Die ELT war nach der Injektion deutlich verkürzt. Das Maximum des Effekts fanden wir 45 Minuten p. i. mit einer Verkürzung der ELT um durchschnittlich 40 % des Ausgangswertes. Da kein zeitlicher Zusammenhang mit der initialen Hypokoagulabilität bestand, konnte eine Gerinnungshemmung als Ursache für die ELT-Verkürzung ausgeschlossen werden. Bei Testung der Euglobuline auf Fibrinplatten und Fibrinröhrchen stellten wir keine Zunahme der lytischen Aktivität fest. Wahrscheinlich sind diese Verfahren zu unempfindlich.

Die Verkürzung der ELT nach der Injektion von NPP weist hin auf eine gesteigerte Aktivatoraktivität. NPP selbst besitzt jedoch nach den Ergebnissen unserer in vitro Experimente keine Aktivatoreigenschaften. Möglicherweise induziert NPP in vivo eine Freisetzung körpereigener Aktivatoren aus den Geweben. Zur weiteren Klärung der Wirkung von NPP auf die Fibrinolyse sollte daher versucht werden, Plg-reiche SFP's zum empfindlichen und spezifischen Nachweis von Aktivatoren herzustellen.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBRECHTSEN, O.K.:
The Fibrinolytic Activity of Human
Tissues.
Brit. J. Haemat. 3, 284 (1957)
2. ALLINGTON, M.J.:
Fibrinogen and Fibrin Degradation Pro-
ducts and the Clumping of Staphylococ-
ci by Serum.
Brit. J. Haemat. 13, 550 (1967)
3. ASTRUP, T.:
Fibrinolysis: An Overview.
In: Progress in Chemical Fibrinolysis
and Thrombolysis, Vol. 3, ed. by J.F.
Davidson, R.M. Rowan, M.M. Samama and
P.C. Desnoyers, Raven Press, New York
1978
4. BEITINGER, B.:
Über die fibrinolytische Aktivität von
Humanplasma unter verschiedenen Lage-
rungsbedingungen, gemessen mit der
Standardpapierfibrinolyse.
Med. Diss. München 1973
5. BLATT, W.F., H. SEGAL, J.L. GRAY:
Thromb. Diath. Haemorrh. 11, 393 (1973)
6. BRAKMAN, P., T. ASTRUP:
The Fibrin Plate Method for Assay of
Fibrinolytic Agents.
In: Thrombosis and Bleeding Disorders.
Theory and Methods. Ed. by N.U. Bang,
F.K. Beller, E. Deutsch and E.F. Mam-
men. Georg Thieme Verlag, Stuttgart,
Academic Press, New York, London, 1971
7. BÜRGI, W.:
Die Zuverlässigkeit klinisch-chemi-
scher und hämatologischer Laboratori-
umsanalysen.
Schweiz. med. Wschr. 102, 367 (1972)
8. COCCHERI, S., V. DE ROSA, K. CAVALLARONI, M. POGGI:
Activation of Fibrinolysis by Means of
Sulfated Polysaccharides: Present Sta-
tus and Perspectives.
In: Progress in Chemical Fibrinolysis
and Thrombolysis, Vol. 3, ed. by J.F.

Davidson, R.M. Rowan, M.M. Samama and
P.C. Desnoyers, Raven Press, New York
1978, pp. 461 - 475

9. COCCHERI, S., V. DE ROSA, G. PELUSI, B. MORETTI, T.
CAMERINI, M. BERNARDINI:
The Effect of Some Fibrinolytically
Active Sulfated Polysaccharides and a
Polydesoxynucleotide on the Inhibition
of Factor Xa.
In: Progress in Chemical Fibrinolysis
and Thrombolysis IV, 61 (1979)
10. COLLEN, D., F. DE COCK, M. VERSTRAETE:
Immunochemical Distinction between
Antiplasmin and Alpha1 - Antitrypsin.
Thromb. Res. 7, 245 (1975)
11. CONRAD, J.:
Plasma Plasminogen Activator - Clot
Lysis Assay Techniques.
In: Progress in Chemical Fibrinolysis
and Thrombolysis, Vol. 2, ed. by J.F.
Davidson, M.M. Samama and P.C. Des-
noyers, Raven Press, New York, 1976,
pp. 15 - 23
12. COPLEY, A.L.:
Effect capilloragique de la fibrino-
lyse.
Arch. int. Pharmacodyn. 99, 426 (1954)
13. FEARNLEY, G.R.:
Fibrinolysis.
Edward Arnold Publishers LTD, London,
1965, pp. 14 - 16
14. GOOSSENS, N.:
Halbautomatische Fibrinolysebestimmung
mit dem Standardfibrinpapier.
Vortrag auf der Tagung der DAB in Essen
am 25. 2. 1977
15. GOOSSENS, N.:
Standardisierte Fibrinolysebestimmung.
Med. Welt 21/42, 1816 (1970)
16. GOOSSENS, N., A. WALCHER:
Paper-Fibrinolysis - A New Quantitative
Photometric Fibrinolysis Method.
Proc. of the IX Congr. of the internat.
Soc. of Haematol., Vol. II, Sydney 1966
17. GRAEFF, H., F.K. BELLER:
Fibrinolytic Activity in Whole Blood,
Dilute Blood, and Euglobulin Clot Lysis

Time Tests.

In: Thrombosis and Bleeding Disorders. Theory and Methods. Ed. by N.U. Bang, F.K. Beller, E. Deutsch and E.F. Mammen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Academic Press, New York, London, 1971

18. HALSE, TH.: Aktivierung der Fibrinolyse und Thrombolyse durch Polysaccharidschwefelsäureester (Heparin, Heparinoide).
Arzneim. Forschung 12, 574 (1962)
19. HALSE, TH.: Enzymologie der spontanen und therapeutisch induzierten Fibrinolyse.
ViHoFe Band XI, Heft 1 (1960)
20. HALSE, TH.: Fibrin, Fibrinolyse und Arteriosklerose.
Med. Welt 33/34, 1662 (1960)
21. HALSE, TH.: Polyelectrolytes as Activators of Fibrinolysis and Thrombolysis.
Sangre 9, 149 (1964)
22. HAMMERL, H., CH. KRÄNZL, O. PICHLER, M. STUDLAR:
Med. Welt 18, 638 (1967)
23. HARENBERG, J., E. WALTER, E. WEBER:
Die intraindividuelle Streuung der fibrinolytischen Aktivität bei Probanden.
Klin. Wschr. 56, 445 (1978)
24. HARTERT, H.: Die Thrombelastographie. Eine Methode zur physikalischen Analyse des Blutgerinnungsvorganges.
Z. ges. exp. Med. 117, 189 (1951)
25. HAWIGER, J., S. NIEWIAROWSKI, V. GUREWICH, D.P. THOMAS:
Measurement of Fibrinogen and Fibrin Degradation Products in Serum by Staphylococcal Clumping Test.
J. Lab. Clin. Med. 75, 93 (1970)
26. HEDNER, U.: Scand. J. Haemat. 11, 398 (1973)
Zitiert nach HEIMBURGER, N. (29)

27. HEDNER, U., I.M. NILSSON:
Clinical Experience with Determination
of Fibrinogen Degradation Products.
Acta med. scand. 189, 471 (1971)
28. HEIMBURGER, N.:
Biochemistry of Proteinase Inhibitors
from Human Plasma: A Review of Recent
Development.
Bayer-Symposium V "Proteinase Inhibi-
tors", pp. 14 - 22 (1974)
29. HEIMBURGER, N.:
Properties and Role of Antiproteases.
Reprinted from: Lung Metabolism. Pro-
teolysis and Antiproteolysis, Biochemi-
cal Pharmacology, Handling of Bioactive
Substances. Academic Press New York,
San Francisco, London, 1975, pp. 3 - 24
30. HENK, W., G. NEBOSIS:
Untersuchung über den Einfluß eines
Pentosanpolysulfoesters auf Blutgerin-
nung und Fibrinolyse.
Wiener klin. Wschr. 80, Nr. 10, 191
(1958)
31. HESS, H., A. MIETASCHK, H. INGRISCH:
Niedrig dosierte thrombolytische The-
rapie zur Wiederherstellung der Strom-
bahn bei arteriellen Verschlüssen.
Dtsch. med. Wschr. 105, 787 (1980)
32. KALBHEN, D.A.:
Biochemisch-pharmakologische Grundla-
gen zur antiphlogistisch-antirheuma-
tischen Wirkung von Pentosanpolysulfat.
Wiener klin. Wschr. 90, Nr. 3, 101
(1978)
33. KAULLA, K.N., VON, R.L. SCHULTZ:
Methods for the Evaluation of Human
Fibrinolysis.
Amer. J. clin. Path. 29, 1041 (1958)
34. KLINE, D.L., L.B. FISHMAN:
Proactivator Function of Human Plasmi-
nogen as Shown by Lysine Esterase
Assay.
35. KOLLER, F.:
Fibrinolyse.
Schweiz. med. Wschr. 44, 1233 (1960)

36. LASSEN, M.:
Heat Denaturation of Plasminogen in
the Fibrin Plat Method.
Acta physiol. scand. 27, 371 (1952)
37. LIPINSKI, B., J. HAWIGER, J. JELJASZEWICZ:
Staphylococcal Clumping with Soluble
Fibrin Monomer Complexes-
J. Exp. Med. 126, 979 (1967)
38. LIPINSKI, B., A. NOWAK, A. ODRZYWOLSKA, J. DOSIAK:
Relationship between Plasma Fibrinoly-
tic Activity and Serum Fibrinogen De-
gradation Products (FDP) Tested by Va-
rious Methods.
Thrombosis 1, 83 (1971)
39. LOO, J., VAN DE:
Leistungsfähigkeit und Grenzen von
Funktionsprüfungen des fibrinolyti-
schen Systems.
Internist 14, 170 (1973)
40. MARKWARDT, F., H.-P. KLÖCKING:
Heparin-Induced Release of Plasmino-
gen Activator.
Haemostasis 6, 370 (1977)
41. MARTIN, M.:
Studies on Activator Formation in Hu-
man Plasma with Streptokinase.
I. Experimental Studies.
Thromb. Diath. Haemorrh. 30, 381 (1973)
42. MARTIN, M.:
Studies on Activator Formation in Hu-
man Plasma with Streptokinase.
II. Quantitative Activator and Plasmi-
nogen Measurements during Continuous
and Intermittent Streptokinase Infu-
sion.
Thromb. Diath. Haemorrh. 30, 393 (1973)
43. MARTIN, M.:
The Fibrinolytic Effect of Euglobulin
Fraction from Human Plasma before and
after Addition of an Acid Polysaccha-
ride (SP 54).
In: Synthetic Fibrinolytic Thrombolytic
Agents; Chemical, Biochemical, Pharma-
cological and Clinical Aspects. Ed. by
K.N. v. Kaulla and J.F. Davidson.
Springfield: Thomas 1975, pp. 276 - 283

44. MERCKL, C., A. STEMBERGER, S. HAAS, G. BLÜMEL:
Action of Sodium-Pentosansulfate
(SP 54) on Blood Coagulation in Com-
parison with Commercial Heparin Pre-
parations.
VIth International Congr. on Thrombo-
sis, Monte Carlo, 1980
45. METZE, R., P.G. LINKE:
Ein Schnelltest zur Erfassung von
fibrinolytischer Aktivität.
Z. med. Labortechn. 13, 75 (1972)
46. MYSLIWIEC, M., H. ARNESEN, H.C. GODAL:
The Effect of Fibrinogen Degradation
Products on Plasmin Activity.
Thromb. Diath. Haemorrh. 29, 592 (1973)
47. NILEHN, J.-E.:
Separation and Estimation of Split
"Products" of Fibrinogen and Fibrin
in Human Serum.
Thromb. Diath. Haemorrh. 18, 487 (1967)
48. NILSSON, I.M.:
Methods for Assessment of Fibrinolytic
Activator Activity.
In: Synthetic Fibrinolytic Thrombolytic
Agents; Chemical, Biochemical, Pharma-
cological and Clinical Aspects. Ed. by
K.N. v. Kaulla and J.F. Davidson.
Springfield: Thomas 1975, pp. 20 - 49
49. RAMM, B., G. HOFMANN:
Biomathematik und medizinische Statis-
tik.
Stuttgart: Enke, 1976
50. RATH, H.:
Untersuchungen über behandlungsspezifische Nebenwirkungen von Clofibrat und einer Kombination von Clofibrat und Orotsäure auf das Gerinnungs- und Fibrinolyse-System und über eine Modifikation der Standardpapierfibrinolyse nach Goossens.
Med. Diss. München 1977
51. SCHNEIDER, J., D. BIERBAUM, F. MROSS, H. KAPP-SCHWOERER:
Medikamentöse Thrombose- und Embolie-
prophylaxe mit SP 54 bei der Therapie
gynäkologischer Karzinome mit Radium
und Telekobaltbestrahlung.
Med. Welt 18/23, 1446 (1967)

52. SCHWICK, G.:
Beiträge zur Diagnostik von Gerinnungsstörungen.
Behringwerke, Laboratoriumsblätter 1,
pp. 87 - 98 (1961)
53. SCHWICK, H.G., N. HEIMBURGER:
Biochemie der Fibrinolyse.
In: Hiemeyer, V.: Therapeutische und
experimentelle Fibrinolyse.
F.K. Schattauer, Stuttgart 1969,
pp. 9 - 26
54. SJOHOLM, J., B. WIMAN, P. WALLEN:
Studies on the Conformational Changes
of Plasminogen Induced During Activation
to Plasmin and by 6-Aminohexanoic
Acid.
Eur. J. Biochem. 39, 471 (1973)
55. SPÖTTL, F., R. CONSTANTINI:
Die Bedeutung des Proaktivators im
fibrinolytischen Fermentsystem.
Thromb. Diath. Haemorrh. 18, 416 (1967)
56. STAMM, H.:
Einführung in die Klinik der Fibrinolyse.
S. Karger, Basel 1962, pp. 1 - 103
57. THORSEN, S.:
Differences in the Binding of Fibrin to
Native Plasminogen and Plasminogen Modified
by Proteolytic Degradation Influence of ϵ -Aminocarboxylic Acids.
Biochim. Biophys. Acta 393, 55 (1975)
58. THYM, W.:
Zur Vereinfachung und Beschleunigung
des Analysenvorganges der Standardfibrinpapier-Lysebestimmung.
Med. Diss. München 1979
59. VINAZZER, H.:
Gerinnungsstörungen in der Praxis. Labordiagnostik, Klinik, Therapie.
G. Fischer Verlag, Stuttgart 1972,
pp. 18 - 20 und 80 - 82
60. VINAZZER, H., S. HAAS, A. STEMBERGER:
Influence on the Clotting Mechanism of
Sodium Pentosan Polysulfate (SP 54) in
Comparison to Commercial Beef Lung Sodium Heparin.
Thromb. Res. 20, 57 (1980)

61. VINAZZER, H., A. STEMBERGER, S. HAAS, CH. MERCKL:
Beeinflussung der Gerinnung durch niedermolekulare Heparinanaloge.
Vortrag auf der Tagung der DAB 1980
62. WACHTER, H., W. GÜTTER, A. HANSEN, G. SALLABERGER:
Eine Störung durch Elektrolyte bei der Färbung elektrophoretisch aufgetrennter Eiweißkörper mit Amidoschwarz 10 B.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8, 27 (1970)
63. WALLEN, P., B. WIMAN:
Characterisation of Human Plasminogen. II. Separation and Partial Characterisation of Different Molecular Forms of Human Plasminogen.
Biochim. Biophys. Acta 257, 122 (1972)
64. WENZEL, E., H. HOLZHÜTER, F. MUSCHIETTI, B. ANGELKORT, H.-G. OCHS, S. PUSZTAI-MARKOS, H. NOWAK, H. STUERNER:
Zuverlässigkeit des Fibrinogen-(Fibrin) Spaltproduktnachweises im Plasma mit Thrombinkoagulase-, Reptilase- und Thrombin-Gerinnungszeit.
Dtsch. med. Wschr. 99, 746 (1974)
65. WIMAN, B., D. COLLEN:
On the Kinetics of the Reaction between Human Antiplasmin and Plasmin.
Eur. J. Biochem. 84, 573 (1978)
66. WIMAN, B., P. WALLEN:
The Specific Interaction between Plasminogen and Fibrin. A Physiological Role of the Lysine Binding Site in Plasminogen.
Thromb. Res. 1, 213 (1977)
67. WITT, J.:
Biochemie der Blutgerinnung und Fibrinolyse.
Verlag Chemie, Weinheim 1975, pp. 103 - 120
68. WITTE, E.:
Beziehungen der Fibrinolyse zum Gerinnungsmechanismus.
In: Hiemeyer, V.: Therapeutische und experimentelle Fibrinolyse.
F.K. Schattauer, Stuttgart 1969, pp. 64 - 74

69. YASUKOUCHI, T., M. FUJINE, S. KOHN, S. SAKURAMA, T.
MORIOKA, A. MIKAMI, M. IJU, S. NAKAGAWA:
A Method for the Measurement of Fibrinolytic Activity Based on One Dimensional Diffusion Using Small Glass Tubes.
II. With Special Reference to the Differences between the Use of Plasminogen-Rich Fibrinogen and that of Plasminogen-Free Fibrinogen as the Substrates.
Thrombos. Haemostas. 37, 456 (1977)
70. YASUKOUCHI, T., T. WATANABE:
A New Method Based on One Dimensional Diffusion Using Small Glass Tubes for the Measurement of Fibrinolytic Activity.
I. Fibrinolytic Activity of Plasmin and "Euglobulin + Streptokinase".
Thromb. Diath. Haemorrh. 28, 329 (1972)

LEBENS LAUF

Am 14. 06. 1957 wurde ich als Sohn des Bankangestellten Hans Eisele und seiner Ehefrau Anna in Ulm geboren.

Ich besuchte die Volksschule in Neu-Ulm und das Gymnasium Neu-Ulm, wo ich im Sommer 1976 das Abitur ablegte.

Vom 01. 07. 1976 bis zum 30. 04. 1977 leistete ich als Sanitäts-soldat der Bundeswehr einen Teil meines Grundwehrdienstes ab.

Im Sommersemester 1977 begann ich das Medizinstudium an der Universität München.

Hier legte ich im Frühjahr 1979 die ärztliche Vorprüfung, im Frühjahr 1980 den ersten Teil der ärztlichen Prüfung und im Frühjahr 1982 den zweiten Teil der ärztlichen Prüfung ab.

Vom Sommer 1980 bis zum Herbst 1981 arbeitete ich im hämostaseologischen Labor der Medizinischen Poliklinik der Universität München an dieser Dissertation.

